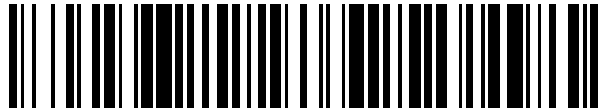


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 404**

51 Int. Cl.:

**G01N 15/14** (2006.01)

**C03B 23/047** (2006.01)

**C03C 27/00** (2006.01)

**G01N 21/05** (2006.01)

**G01N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/029460**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14144868**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14721665 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 2972209**

54 Título: **Células de flujo óptico compuestas y método de fabricación y uso**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361792802 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**31.03.2020**

73 Titular/es:

**BECKMAN COULTER, INC. (100.0%)  
250 S. Kraemer Boulevard  
Brea, CA 92821, US**

72 Inventor/es:

**GRAHAM, MARSHALL DONNIE;  
GRAHAM, WILLIAM GERRY;  
CLARKIN, JAMES P.;  
WELLS, MARK A.;  
CANO, JOSE M.;  
ARBOLEDA, CARLOS ALBERTO y  
SANCHEZ, ARMANDO J.**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 751 404 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Células de flujo óptico compuestas y método de fabricación y uso

5 **Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas****Antecedentes de la invención**

10 Realizaciones de la presente invención se refieren de manera general a aparatos y métodos para diferenciar tipos constituyentes de cuerpos formados (por ejemplo, células u otras partículas pequeñas) en muestras líquidas (por ejemplo, sangre completa u otros líquidos con suspensión de partículas). Más particularmente, realizaciones se refieren a mejoras en conjuntos de transductor para su uso en analizadores de hematología y otros citómetros de flujo que funcionan para detectar, caracterizar y diferenciar cuerpos formados en tales muestras mediante diversos parámetros ópticos, con frecuencia en combinación con parámetros no ópticos adquiridos mediante el principio de Coulter. Realizaciones de la invención se refieren además a mejoras en células de flujo óptico usadas en tales conjuntos de transductor y a mejoras en métodos para detectar parámetros caracterizantes a partir de cuerpos formados que transitan por la porción de adquisición de parámetros de tales células de flujo.

20 Los análisis de líquidos corporales de pacientes pueden automatizarse como ayuda en el diagnóstico del estado de salud de un paciente. Tales análisis pueden incluir hacer fluir una porción preparada de tales líquidos corporales a través de un conjunto de transductor para derivar determinados parámetros característicos de los diversos tipos o subpoblaciones diferentes de cuerpos constituyentes formados en los mismos, diferenciar y numerar los diversos tipos o subpoblaciones de los cuerpos formados basándose en los parámetros derivados, y procesar o correlacionar la información resultante para proporcionar un diagnóstico deseado. Por ejemplo, estas tareas pueden realizarse para sangre completa mediante caracterización de células sanguíneas en la misma mediante citómetros de flujo y analizadores de hematología automatizados.

30 Un límite de prestaciones fundamental de algunos instrumentos actuales del tipo indicado anteriormente se origina en la transducción de propiedades de cuerpos formados para dar los parámetros caracterizantes usados para asignar cuerpos formados individuales a subpoblaciones específicas. Para muchas aplicaciones, métodos de transducción óptica por sí solos proporcionan medios eficaces para caracterizar cuerpos formados. En estas aplicaciones, se interroga una porción de una muestra preparada con radiación óptica a medida que fluye a través de un paso formado en un elemento ópticamente transparente, o célula de flujo, que forma una porción de un módulo de transductor. Fotodetectores adecuados, que también forman parte del módulo, están posicionados para detectar diversos parámetros ópticos a partir de un cuerpo formado irradiado incluyendo, por ejemplo, su absorbancia óptica del haz de interrogación, su fluorescencia a diferentes longitudes de onda, y su efecto de dispersión de la luz dentro de uno o más alcances angulares. En estas aplicaciones únicamente ópticas, se apreciará que la extensión física del paso de célula de flujo puede ser relativamente grande sin afectar adversamente a la determinación de estos parámetros ópticos. Sin embargo, en otras aplicaciones citométricas en las que tales parámetros ópticos se combinan con parámetros no ópticos determinados de manera simultánea, en particular los basados en el principio de Coulter (comentado más adelante), puede necesitarse restringir drásticamente tanto la sección transversal como al menos una longitud de una porción del paso de célula de flujo para lograr una intensidad de señal adecuada.

45 Debido a las limitaciones de los métodos de detección óptica que existían entonces, W. H. Coulter diseñó un método electrónico para caracterizar cuerpos formados minúsculos suspendidos en un líquido. El ahora familiar principio de Coulter permite la determinación del volumen de cuerpos formados, haciendo fluir una porción de muestra preparada en un líquido eléctricamente conductor a través de una zona de detección de partículas (o conducto de volúmetro) simultáneamente con una corriente eléctrica. La resistividad eléctrica del líquido con suspensión de partículas difiere de la de las partículas, permitiendo el contraste eléctrico contar y dimensionar las partículas que transitan por el conducto de volúmetro. Aunque se comentan otras geometrías en la patente estadounidense n.º 2.656.508 de Coulter, los conductos de volúmetro son habitualmente perforaciones cilíndricas en una oblea aislante delgada, determinando el área en sección transversal y la longitud del conducto la sensibilidad volumétrica, el volumen de coincidencia y la dimensión máxima de cuerpo formado que puede pasar; por tanto, los diámetros de conducto son normalmente como máximo un orden de magnitud mayores que el diámetro de los cuerpos formados típicos que van a analizarse. El conducto de volúmetro forma la única comunicación de fluido entre dos cámaras aislantes del conjunto de transductor, sin requisitos sobre las características ópticas del material de oblea que rodea al conducto. Inicialmente, se proporcionó una corriente continua (CC) a través del conducto, y se adquirieron señales de volumen (V) de Coulter de resistencia proporcionales al volumen de cuerpos formados que transitan mediante electrodos posicionados fuera de los extremos opuestos del conducto de volúmetro. En la patente estadounidense n.º 3.380.584 se adaptaron diferencias en las señales de V de Coulter para clasificar subpoblaciones de tales cuerpos formados a sitios de recogida independientes. En la patente estadounidense n.º 3.502.974 concedida a W. H. Coulter y W. R. Hogg, se hizo que la corriente de excitación a través del conducto incluyera al menos una corriente alterna (CA), permitiendo así la determinación de las componentes no sólo resistiva sino también reactiva de la corriente de conducto resultantes de su modulación mediante paso de un cuerpo formado. Cuando tales corrientes incluyen una que tiene una frecuencia en el rango de radiofrecuencia (RF) (por ejemplo, 22,5 MHz), las

componentes respectivas permiten la estimación del volumen (V) y la conductividad eléctrica (C) de un cuerpo formado, y se dice que la razón de las componentes reactiva con respecto a resistiva es la "opacidad" del cuerpo formado.

5 En la patente estadounidense n.º 5.125.737 concedida a C. M. Rodriguez y W. H. Coulter, legalmente cedida, (a continuación en el presente documento, la patente '737) los parámetros V y C de Coulter se combinan con parámetros de dispersión óptica (S). En determinados analizadores de hematología que incorporan esta tecnología de VCS, se hace pasar una muestra de la sangre diluida a través de un conjunto de transductor citométrico que incluye una célula de flujo óptico fabricada a partir de un segmento corto de tubos cilíndricos ópticamente transparentes. En  
10 la técnica de elaboración de vidrio se conoce estirar tubos a partir de una preforma más grande de diversos diámetros internos y externos y que tiene una pared cilíndrica de hasta varios centímetros de grosor. Durante la operación de estiramiento, se calienta la preforma hasta una temperatura predeterminada a la que su viscosidad permite la deformación, tras lo cual se estira axialmente, habitualmente en una dirección verticalmente descendente, a una velocidad constante y predeterminada. Durante este procedimiento, los diámetros de las secciones transversales interior y exterior de la preforma se reducen sustancialmente conservándose sustancialmente las formas circulares originales, siendo tales formas la forma de energía mínima, y se reduce significativamente el grosor de la pared de la preforma. Este procedimiento de estiramiento se ha adaptado para formar tubos transparentes de pared gruesa para su uso en la producción de células de flujo de una sola pieza (monolíticas) sin interrupciones tal como se describe en la patente '737. Tras estirar una preforma hasta un diámetro interno preferido  
20 (por ejemplo, 50 micrómetros), se cortan los tubos en segmentos de una longitud preferida (por ejemplo, de aproximadamente 6 mm), y una parte plana adecuada (por ejemplo, de 1 mm de anchura) se envuelve y se pule sobre la superficie cilíndrica exterior de los segmentos que, como resultado del estiramiento, se han reducido hasta un diámetro de aproximadamente 3,5 mm. La parte plana proporciona un orificio óptico a través del cual puede acoplarse un haz de radiación (por ejemplo, procedente de un láser de HeNe), sustancialmente perpendicular al mismo y a lo largo de un diámetro, en el canal cilíndrico central en el tubo extraído. Se hace que la parte plana sea sustancialmente paralela al eje de canal en una ubicación arbitraria en la superficie cilíndrica exterior, por ejemplo, para evitar o eliminar un defecto óptico inaceptable en la pared de segmento. Se aumenta parcialmente el canal cilíndrico perforando un segmento desde ambos extremos hasta un diámetro adecuado (por ejemplo, de aproximadamente 1,2 mm), dejando *in situ* una longitud corta (por ejemplo, de aproximadamente 65 micrómetros)  
30 del canal original en el centro de la célula de flujo que desemboca en cada extremo en el interior de un rebaje en forma de copa (por ejemplo, con un radio de aproximadamente 600 micrómetros) sustancialmente coaxial con el canal original y continuo con las perforaciones de extremo. En uso, la longitud del canal original en la sección longitudinal así formada funciona como conducto de volúmetro de Coulter, y las perforaciones cilíndricas del paso resultante se comunican con cámaras de electrodos externas en dicho conjunto de transductor, mediante lo cual puede hacerse que el líquido de muestra en un líquido de recubrimiento de enfoque hidrodinámico pase de manera central a través del conducto de volúmetro. Se adquieren los parámetros V y C de Coulter a partir de electrodos tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 2.656.508 y 3.502.974 anteriormente mencionadas a medida que pasan cuerpos formados a través del conducto de volúmetro; mientras tanto, se adquieren simultáneamente parámetros de dispersión óptica (S) a partir del haz de radiación a partir de los cuerpos formados individuales a medida que pasan unos tras otros a través de dicho haz que atraviesa la zona de detección de parámetros formada por el conducto de volúmetro cilíndrico.

En determinados analizadores de hematología, la sección transversal circular repetible del conducto de volúmetro de célula de flujo es de dimensión diseñada, y la superficie cilíndrica aplanada que forma la envuelta de la célula de flujo de la patente '737 es sustancialmente paralela al eje del conducto. El haz de radiación entrante se lleva a través de la parte plana hasta un área en sección transversal mínima dentro del conducto de volúmetro circular. Se dispersa luz procedente del haz por células nucleadas que pasan en la muestra, y fotodetectores posicionados adecuadamente cerca del eje óptico detectan la radiación sometida a dispersión directa dentro de bandas angulares específicas, permitiendo así que se desarrollen los parámetros S anteriormente mencionados. Tales señales de dispersión directa (FS) adquiridas a través de la pared de tales células de flujo permiten una numeración, diferenciación y clasificación fiables de leucocitos individuales normales en monocitos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos cuando se correlacionan apropiadamente con parámetros V y C de Coulter. Estos datos de diagnóstico tienen una historia demostrada de utilidad clínica.

55 En superficies de contacto entre materiales transparentes diferentes un rayo de radiación incidente de longitud de onda  $\lambda$ , la normal con respecto a la tangente de la superficie de contacto en el punto de la incidencia del rayo, y el rayo emergente a partir de la superficie de contacto son todos ellos coplanares. Las trayectorias de rayo siguen la ley de Snell,  $n_1(\lambda) \sin\theta_1 = n_2(\lambda) \sin\theta_2$ , donde  $\theta_1$  y  $\theta_2$  son los ángulos respectivos a los que un rayo incide sobre la superficie de contacto y emerge de la misma, ambos con respecto a dicha normal, y  $n_1(\lambda)$  y  $n_2(\lambda)$  son los índices de refracción en los lados incidente y de salida de la superficie de contacto. Su bajo índice de refracción [ $n(\lambda) \approx 1,457$ ]  
60 condujo a que se prefiriera sílice fundida ( $\text{SiO}_2$ ) para su uso en las células de flujo de la patente '737 anteriormente mencionadas. Para líquidos de suspensión típicos, el índice de refracción es de aproximadamente 1,333, mientras que el del aire es de 1,000. Para cualquier geometría de pared en la sílice fundida y  $\sin\theta_2$  menor que la unidad, los rayos que se originan cerca del eje de célula de flujo se refractarán hacia la superficie normal en su incidencia sobre la superficie de conducto ( $\sin\theta_2 \approx 0,915 \sin\theta_1$ ) pero alejándose de la misma en su incidencia sobre la superficie de

envuelta ( $\text{sen}\theta_2 \approx 1,457 \text{ sen}\theta_1$ ). La radiación dispersada que se propaga desde cuerpos formados dentro del conducto de volúmetro de la patente '737 hasta los fotodetectores relevantes pasa a través de líquido de suspensión en contacto con la superficie de conducto cilíndrico y la superficie de envuelta cilíndrica en contacto con aire ambiental, siendo por tanto la pared cilíndrica entre dichas superficies un elemento de refracción no axisimétrico. Para rayos que se originan en el eje de células de flujo de la patente '737 y que salen del conducto de volúmetro en el plano que incluye el eje óptico del haz de radiación entrante,  $\theta_1 = \theta_2 = 0$ , y tales rayos pasan a través de ambas superficies de la pared de célula de flujo sin refracción significativa. Sin embargo, si  $n_1(\lambda) \neq n_2(\lambda)$ , tales rayos que se propagan formando cualquier ángulo  $\theta$  con respecto a dicho plano se refractarán en ambas superficies de pared, aumentando la desviación de refracción con respecto a la trayectoria de incidencia con los efectos combinados de  $\theta$  y la desigualdad entre  $n_1(\lambda)$  y  $n_2(\lambda)$  siendo la refracción simétrica alrededor de dicho plano. Por tanto, se refractará de manera asimétrica un cono circular de rayos que salen a través de la pared de célula de flujo desde un origen en la intersección de los ejes ópticos y de conducto, oscilando la desviación de refracción desde cero donde dicho plano interseca la superficie o bien de conducto o bien de envuelta hasta una reflexión interna total en la superficie de envuelta si  $\theta_1$  hace que  $1,457 \text{ sen}\theta_1 \geq 1$ . Debido a estos efectos de refracción no axisimétricos, la radiación dispersada que pasa a través de la pared de célula de flujo adquiere astigmatismo sustancial que, afectando a la dispersión a partir de objetos pequeños más que a la de objetos más grandes, afecta a la capacidad para diferenciar cuerpos formados caracterizados por una estructura granular. Las superficies de paredes planas paralelas minimizan tales efectos de refracción asimétricos, y un cono de rayos de este tipo experimenta refracción uniforme alrededor del eje óptico del haz de radiación tal como se determina mediante el ángulo de incidencia y la diferencia entre  $n_1(\lambda)$  y  $n_2(\lambda)$  a través de ambas superficies de pared. Tales paredes mejoran la adquisición no sólo de S sino también de otras señales ópticas, y se ha dirigido un extenso esfuerzo hacia células de flujo que tienen un canal prismático rodeado por paredes planas, por ejemplo, una realización modificada en la patente '737 incorpora una célula de flujo que incluye un conducto de volúmetro cuadrado dentro de una envuelta similar.

En la patente estadounidense n.º 6.228.652 concedida a C. M. Rodriguez *et al.*, legalmente cedida, (a continuación en el presente documento, la patente '652), se da a conocer un aparato experimental que puede proporcionar la adquisición simultánea de diversas señales ópticas, de V de Coulter y de C de Coulter, a partir de un cuerpo formado individual, con posterior diferenciación de subpoblaciones de cuerpos formados en sangre completa basándose en las mismas. Una de las estructuras de célula de flujo cuadrada ilustradas en la patente '737 es la célula de flujo preferida en la patente '652 y se comenta con referencia a la figura 3 en la misma. Esta célula de flujo comprende un elemento ópticamente transparente que tiene una envuelta exterior prismática de sección transversal cuadrada, que mide aproximadamente 4,2 mm en cada lado, y que tiene una longitud de aproximadamente 6,3 mm. (Tal como se usa a continuación en el presente documento, el término "prismático" se refiere a cualquier figura tridimensional compuesta por tres o más lados intersecantes que son planos, y un par de extremos opuestos que tienen forma poligonal. A continuación en el presente documento, se usa "poligonal" para hacer referencia a cualquier figura plana cerrada que tiene al menos tres lados sustancialmente rectos, y "plano" tal como se usa en el presente documento se refiere a una superficie que tiene un área que es predominantemente plana). Ubicado de manera central dentro de dicho elemento prismático hay un conducto de volúmetro prismático que tiene una sección transversal cuadrada aproximadamente 50 micrómetros en cada lado y una longitud de aproximadamente 65 micrómetros; la sección transversal y longitud relativamente pequeñas del conducto son necesarias para alcanzar una sensibilidad volumétrica y volumen de coincidencia razonables para adquirir dichas señales de V y C. Por tanto, la razón de las áreas en sección transversal respectivas de dicho conducto y envuelta es de aproximadamente 0,00014, y el grosor de pared es de aproximadamente 2,075 mm. Para limitar de manera aceptable el contenido en aberraciones de señales ópticas, las superficies de la envuelta y el conducto prismáticos deben ser sustancialmente paralelas, con planitud óptica. Esta combinación de geometrías en sección transversal cuadrada/cuadrada, grosor de pared, paralelismo de superficies de pared y planitud de pared es difícil de lograr, una dificultad compuesta por las pequeñas dimensiones requeridas para conductos de volúmetro.

Para fabricar células de flujo del tipo preferido en la patente '652, se ha usado un procedimiento de planarización relativamente complejo en el que cuatro placas transparentes, por ejemplo, fabricadas preferiblemente a partir de una forma de sílice, se pulen hasta un grosor predeterminado y se acaban y se ensamblan para formar la estructura compuesta de la figura 1. Durante el ensamblaje, un par de dichas placas CC1 y CC3 se separan por el otro par CC2 y CC4 para formar dos paredes de la célula 20 de flujo, con el par de placas de separador de igual grosor separadas de manera apropiada una distancia predeterminada de modo que sus bordes opuestos completan un canal 22 interno. Preferiblemente, los elementos CC1-CC4 complementarios tienen dimensiones apropiadas y están unidos en sus superficies de contacto mediante fusión para formar un vástago prismático que tiene un canal 22 interno, recto, que se extiende longitudinalmente con una sección transversal cuadrada uniforme deseada en el mismo. Después se corta este vástago hasta una longitud deseada, por ejemplo, 6,3 mm, y se pulen los segmentos hasta la geometría y dimensiones externas deseadas para formar una célula de flujo que tiene una envuelta prismática, por ejemplo, lados 50 planos opuestos en la figura 1 que tienen una separación de parte plana a parte plana de 4,2 mm. Tales células de flujo óptico compuestas que tienen canales de flujo prismáticos de sección longitudinal constante pero diversas secciones transversales cuadradas se han fabricado variando el grosor y la separación de las dos placas CC2 y CC4 de separador. Para la adquisición de parámetros de Coulter, se forma un paso que incluye un conducto de volúmetro prismático, por ejemplo, el conducto cuadrado de 50 micrómetros por 50 micrómetros descrito anteriormente, en tales células de flujo perforando el canal 22 cuadrado a partir de ambos

extremos tal como se describió anteriormente para la célula de flujo de la patente '737 para formar una zona de adquisición de parámetros. La sección longitudinal de dicho paso es tal que el líquido de muestra en un líquido de recubrimiento de enfoque hidrodinámico pasa de manera central a través del conducto de volúmetro cuadrado formado de ese modo dentro de la célula de flujo. Las placas de separador también pueden separarse mediante una separación que difiere de su grosor, para formar canales de flujo que tienen secciones transversales rectangulares como en la patente estadounidense n.º 4.786.165. Diversas realizaciones de células de flujo producidas mediante el procedimiento de planarización se han adaptado para funcionar en determinados citómetros de flujo. Células de flujo adecuadas para su aplicación en tales instrumentos y producidas mediante el método de la presente invención se ilustran en las figuras 7A, 7B, 12 y 14 respectivas y se comentarán como realizaciones de la presente invención.

Aunque se han producido células de flujo útiles del tipo preferido en la patente '652 mediante el procedimiento de planarización anteriormente descrito, el rendimiento de tales células de flujo procesadas para incluir un conducto de volúmetro es muy bajo, normalmente menos de 1 de cada 3, debido a la debilidad en las uniones fusionadas. Para cuerpos formados que transitan por el conducto de volúmetro interno de células de flujo útiles (por ejemplo, BC2 en la figura 1), las señales ópticas adquiridas a través de las dos ventanas pueden ser sustancialmente repetibles (por ejemplo, las señales de dispersión directa FS resultantes a partir de un sensor colocado fuera de la ventana CC1 y en el eje óptico OA opuesto a la ventana CC3 de entrada para el haz de radiación B en la figura 1). Sin embargo, las adquiridas a través de las dos paredes de la célula 20 de flujo que contiene placas de separador (por ejemplo, señal de dispersión lateral SS adquirida a través de CC2 y señal de fluorescencia F adquirida a través de CC4 en la figura 1) demuestran tanto sensibilidad a la posición de haz de excitación en casos individuales como variabilidad entre unidades en las señales ópticas resultantes, aunque las uniones estén posicionadas sistemáticamente con respecto al eje de excitación óptica. Y dado que los flujos de líquido y las corrientes de excitación de Coulter a través del paso de célula de flujo entran en contacto con las uniones de ensamblaje expuestas, las células de flujo producidas mediante el procedimiento de planarización (por ejemplo, la célula 20 de flujo en la figura 1) también son propensas a modos de fallo posteriores: En primer lugar, irregularidades y bolsas de aire en las uniones fusionadas características del método de planarización dan como resultado el calentamiento localizado debido a la componente de RF de la corriente de excitación de conducto, con el consiguiente fallo de la unión; en segundo lugar, las imperfecciones de unión tienden a agrandarse cuando los flujos de muestra van acompañados por presión cíclica significativa; y finalmente, las células de flujo que se dejan en un aparato almacenado tienden a separarse a lo largo de las uniones debido a la cristalización de sales si se deja que se evaporen reactivos residuales.

También se han usado procedimientos de producción más complejos, en los que diversos sólidos transparentes de geometría predeterminada se ensamblan de manera apropiada, para producir células de flujo óptico compuestas que tienen conductos de volúmetro prismáticos de una geometría y dimensiones deseadas. Si la pared de célula de flujo consistiera en una envuelta esférica que contiene una cavidad esférica concéntrica, un cono de rayos que se originan en la intersección de los ejes óptico y de conducto se propagaría sin refracción; una pared de célula de flujo que incluye una envuelta esférica centrada en el eje del conducto de volúmetro permite la propagación de radiación dispersada con aberraciones de refracción inducidas por la pared mínimas en la medida en que  $n_1(\lambda)$  se aproxima a  $n_2(\lambda)$  en la superficie del conducto. Por tanto, la patente estadounidense n.º 4.348.107 legalmente cedida (a continuación en el presente documento, la patente '107) da a conocer células de flujo óptico en las que un conducto de volúmetro que tiene una sección transversal preferiblemente cuadrada está contenido dentro de una envuelta que tiene una superficie exterior esférica u otra superficie de revolución. (Células de flujo que tienen tal envuelta, pero producidas mediante realizaciones de método de la presente invención, se ilustran en la figura 13A-13C y se comentarán como realizaciones de la presente invención). Tal como se ilustra en la patente '107, tales células de flujo se producen uniendo entre sí cuatro pirámides de base cuadrada, truncadas y complementarias formadas por un material transparente. El vértice de cada pirámide está pulido paralelo a su base y hasta una profundidad calculada para proporcionar un lado del conducto de volúmetro deseado, y después se ensamblan de manera apropiada las pirámides y se unen entre sí de manera adhesiva de modo que los vértices truncados forman un conducto prismático cuadrado sin obstrucciones, formando las caras adyacentes de las pirámides unidas una sección longitudinal de sección decreciente en uno o ambos extremos del conducto. Aunque pueden adquirirse señales ópticas a través de las superficies planas de la envuelta prismática resultante, se prefiere que medios no especificados en la patente '107 proporcionen entonces en la célula de flujo una envuelta formada como superficie de revolución. Una extensión que permite el acoplamiento del líquido de muestra y un líquido de recubrimiento de enfoque hidrodinámico a través del conducto está sellada a la célula de flujo resultante en la que su superficie se interseca mediante uno o ambos de los enfoques formados por los lados expuestos de las cuatro pirámides. La patente '107 indica que las características ópticas y mecánicas de dicha estructura demostraron ser inferiores a las óptimas, presentando fluorescencia o separándose posiblemente las uniones adhesivas, pero no proporciona un método de unión alternativo. El inventor y uno de los coinventores del presente documento publicaron en Applied Optics (26: 3244-3248, 1987) una comparación teórica de las propiedades ópticas de la estructura de célula de flujo de la patente '107 idealizada con las de una célula de flujo que tiene una sección transversal cuadrada en una envuelta prismática cuadrada; no se describió ningún método para la producción de ninguna estructura de célula de flujo. El inventor y otros colaboradores verificaron posteriormente algunas de esas predicciones teóricas en una comparación (Cytometry 20:185-190, 1995) de una realización de la célula de flujo de la patente '107, una que tenía las cuatro pirámides fusionadas entre sí y que por tanto evitaba dichos problemas de uniones adhesivas, con una célula de flujo cilíndrica monolítica tal como se comentó anteriormente con respecto a determinados analizadores de hematología que incorporan tecnología de VCS; la figura 2 en dicha publicación muestra la célula de flujo de la

patente '107 sellada, tras la producción de una envuelta exterior esférica pulida, entre extensiones de las cámaras de plástico que alojan electrodos que permiten la adquisición de señales V y C de Coulter. Tal como se comenta en patentes estadounidenses n.ºs 4.673.288 y 4.818.103, se han usado variaciones del enfoque dado a conocer en la patente '107 para proporcionar conductos de volúmetro prismáticos que tienen una sección transversal triangular en una envuelta de forma similar, mencionándose que estructuras cuadradas, de cinco lados, etc., están dentro del alcance de la invención. Para permitir una recogida eficiente mediante un microscopio de señales ópticas a partir de tales conductos de volúmetro triangulares, en la solicitud de patente estadounidense 2007/0085997 una placa transparente delgada (ventana) reemplaza a una de las pirámides truncadas, completándose la envuelta por los dos componentes complementarios restantes modificados para facilitar la interrogación de cuerpos formados mediante radiación óptica a través de sus paredes. Tal como se apreciará, se requieren múltiples uniones, expuestas al contenido del conducto y sometidas a las desventajas descritas anteriormente para el procedimiento de planarización, en tales células de flujo compuestas que comprenden una pluralidad de tales elementos fusionados. Además, las tolerancias en el mecanizado de vértices de múltiples elementos, en el ensamblaje de los elementos y en la unión de los mismos para formar un conducto de volúmetro se combinan para producir geometría y dimensiones de conducto variables, haciendo que este enfoque sea tanto costoso como poco atractivo como procedimiento de producción y uno que proporciona variabilidad entre unidades en el resultado.

Otras desventajas se originan en las imperfecciones en las uniones expuestas usadas para ensamblar células de flujo compuestas de la técnica anterior tal como se describe en la patente '652 o en la solicitud de patente estadounidense 2007/0085997 y sus precursores. Tales uniones se han realizado mediante procedimientos adhesivos, procedimientos de unión de vidrio a baja temperatura usando agentes químicos o vidrios de soldadura, o procedimientos de fusión a alta temperatura en los que superficies de los componentes complementarios que van a unirse se colocan en estrecha proximidad y se calientan lo suficiente como para provocar que esas superficies se ablanden y se unan entre sí. Las uniones formadas mediante los dos primeros métodos son significativamente menos duraderas que las formadas mediante fusión de los componentes complementarios y pueden dar como resultado fluorescencia de fondo que interfiere con la radiación fluorescente débil emitida por cuerpos formados que transitan en la zona de adquisición de parámetros resultante; además, los agentes de unión pueden extenderse o dejar un residuo más allá de las superficies mecanizadas destinadas a definir una geometría de esquina de la zona de detección y por tanto provocar variabilidad entre unidades impredecible en el flujo de líquido a través de la zona. Alternativamente, agente de unión insuficiente puede llenar de manera inadecuada el hueco entre componentes adyacentes de la célula de flujo compuesta, dejando un espacio vacío que se extiende entre tales componentes a lo largo de la longitud de la esquina que están destinados a formar estos componentes. Las fuerzas viscosas que actúan sobre superficies adyacentes de canales de flujo no cilíndricos se combinan de tal manera que los flujos de fluido cerca de las esquinas experimentan resistencia adicional, y por tanto velocidades de flujo más lentas, que cerca de las porciones centrales de las superficies. Por consiguiente, los cuerpos formados fuera del flujo casi axial en canales no cilíndricos experimentan velocidades de flujo menores y pueden migrar a las esquinas de tales canales de flujo (por ejemplo, durante transiciones de flujo requeridas para la purga de una muestra desde, y la introducción de una muestra diferente en, el conjunto de transductor). Debido a las pequeñas dimensiones de conductos de volúmetro y posibles problemas relacionados con la purga exhaustiva de los mismos, pueden surgir determinados desafíos cuando se adquieren parámetros V y/o C de Coulter e implican complejidad adicional en la instrumentación práctica. Los cuerpos formados típicos tienen como máximo una dimensión de varios micrómetros y por tanto pueden secuestrarse en tales intersticios en uniones imperfectas durante tales transiciones. Al reanudar el flujo continuo las velocidades de flujo bajas inducidas por la viscosidad cerca de las esquinas de canal pueden ser insuficientes para barrer todas de tales células secuestradas hacia fuera, permitiendo el posible remanente de cuerpos formados de una muestra a una muestra posterior. Si un cuerpo formado secuestrado de este tipo fuera de los tipos de célula poco frecuentes críticos para el diagnóstico, no sólo estaría ausente de la primera muestra, sino que podría producirse en una muestra normal posterior. Puede resultar información de diagnóstico engañosa a partir del procesamiento posterior de parámetros adquiridos a partir de ambas muestras como resultado del remanente de cuerpos formados de una muestra de paciente a otra muestra de paciente. Debido a la dificultad en la purga de los pequeños conductos de volúmetro requeridos para detectar parámetros V y/o C de Coulter, la instrumentación que usa células de flujo compuestas de la técnica anterior que incluyen uniones de fusión está sujeta a este último fallo y también a sus implicaciones. Anteriormente se indicó, con respecto a las células de flujo cilíndricas monolíticas, que éstas se formaban fácilmente porque la forma de canal era la forma de energía mínima para el vidrio cuando se ablanda para el estiramiento. También se aplican consideraciones de energía mínima durante la unión por fusión de componentes complementarios y dan como resultado el redondeo de la intersección de las superficies que van a unirse y las superficies destinadas a formar el canal de flujo no cilíndrico. Por tanto, por ejemplo, en células de flujo tales como las usadas en la instrumentación experimental descrita en la patente '652 (es decir, la célula 20 de flujo en la figura 1), los bordes de las dos placas de separador se ablandan y se redondean aproximadamente alrededor de un centro dentro de las placas de separador antes de que el volumen del vidrio se ablande lo suficiente como para unir las superficies que van a unirse; tal redondeo se indica para un borde de este tipo de CC4 mediante R' en la figura 1, pero se aplica a ambos de tales bordes de las placas CC2 y CC4 de separador. Tal como se indica en la figura 1, la sección transversal del canal 22 resultante no es realmente rectilínea, sino que más bien tiene impuestos en dichas cuatro esquinas intersticios adyacentes a las dos placas CC1 y CC3 de ventana y que se extienden varios micrómetros hacia atrás desde la esquina prevista. Se han observado intersticios que se extienden más de 15 micrómetros alejándose del canal de flujo y a lo largo de gran parte de la longitud de canal en células de flujo planarizadas comerciales durante el desarrollo de dicha instrumentación de la patente '652; tienen un radio

perceptible de varios micrómetros en ambas esquinas de ambas placas CC2 y CC4 de separador. Tales intersticios de unión están sujetos al riesgo anteriormente mencionado de remanente de cuerpos formados, con preocupaciones de responsabilidad y regulatorias relacionadas.

5 Al no requerir uniones, las células de flujo realmente monolíticas producidas a partir de una única pieza de material transparente, por ejemplo, las células de flujo de la construcción de la patente '737 anteriormente mencionada, rodean los flujos de líquido y cualquier corriente de excitación de Coulter con una pared homogénea sin uniones y por tanto pueden evitar las limitaciones y desventajas descritas anteriormente para determinadas células de flujo que comprenden componentes unidos de geometrías complementarias. El diseño de una sola pieza de tales células de flujo proporciona un elemento de detección robusto que proporciona tanto geometría y dimensiones controladas en el canal de flujo como función fiable en servicio. Cuando se usan en la adquisición de datos tal como se describe en la patente '737, las señales de dispersión directa (FS) adquiridas a partir de tales células de flujo permiten la diferenciación y numeración fiables de cuerpos formados individuales cuando se correlacionan de manera adecuada con señales V y C de Coulter. Pero tal como se comentó anteriormente, debido a los diámetros necesariamente pequeños de sus conductos de volúmetro circulares, la pared de las células de flujo de la patente '737 actúa como elemento de refracción no axisimétrico, con mayor refracción para la dispersión a partir de objetos pequeños que para objetos más grandes, y las señales de dispersión (S) adquiridas a través de la misma experimentarán un astigmatismo sustancial que limita la capacidad para diferenciar entre determinados tipos de cuerpos formados. Aunque tal diferenciación puede mejorarse añadiendo señales de fluorescencia (F) a diferentes longitudes de onda como en la patente '652, por ejemplo, marcando de manera selectiva los cuerpos formados con colorantes fluorescentes o conjugados de colorante-perla, la dispersión debida a  $n(\lambda)$  provoca que las señales F se vean afectadas de manera incluso más desventajosa por artefactos de refracción inducidos por pared que las señales de dispersión. Células de flujo compuestas que tienen una zona de adquisición de parámetros prismática encerrada por superficies de pared planas (por ejemplo, el conducto de volúmetro cuadrado dado a conocer en la patente '652 o el conducto de volúmetro triangular dado a conocer en la solicitud de patente estadounidense 2007/0085997 y sus precursores) también pueden minimizar los efectos de dispersión. Sin embargo, tal como se indica, tales células de flujo son difíciles de producir mediante métodos de producción convencionales; las uniones expuestas requeridas para el ensamblaje no sólo introducen faltas de homogeneidad ópticas, sino que tienen la posibilidad en servicio tanto de remanente de cuerpos formados entre muestras como de fallo a lo largo del tiempo.

30 Una necesidad citométrica recurrente es adquirir simultáneamente varios tipos de señales ópticas diferentes resultantes de la interacción de los cuerpos formados con una o más fuentes de radiación, es decir, alguna combinación de señales de pérdida de luz axial (ALL); señales de dispersión (S) tales como señales de dispersión directa (FS), dispersión lateral (SS) o retrodispersión (BS); y señales de fluorescencia (F) de múltiples longitudes de onda. En tales aplicaciones las tres o cuatro superficies de envuelta en determinadas células de flujo (es decir, las descritas en la solicitud de patente estadounidense respectiva 2007/0085997 y sus precursores o la patente '652) requieren que una pluralidad de sensores observen la zona de adquisición de parámetros a través de ópticas complejas de división de haz y/o diferenciación de longitud de onda que, además de añadir coste, introducen alineación y otras dificultades ópticas. La necesidad de más trayectorias de detección óptica puede abordarse añadiendo superficies planas a la envuelta de célula de flujo (es decir, tal como se ilustra en la solicitud de patente japonesa sin examinar n.º 62-168033) mediante lo cual la envuelta puede tener una sección transversal pentagonal, hexagonal, heptagonal, etc., de modo que cada medición óptica de interés puede realizarse a través de una superficie independiente de la envuelta. De manera implícita en la discusión anterior sobre la ley de Snell, tales células de flujo que tienen una envuelta poligonal y una zona de adquisición de parámetros cilíndrica pueden reducir los efectos de refracción asimétricos por debajo de los experimentados con células de flujo en las que tanto la envuelta como la zona de detección tienen superficies cilíndricas. Se encontró que las células de flujo experimentales, realizadas formando superficies planas adicionales en relación espacial apropiada con respecto al orificio óptico envueltas sobre la célula de flujo de la patente '737 estirada, reducían los efectos de refracción asimétricos para algunos parámetros caracterizantes ópticos adquiridos a través de dichas superficies pero, debido a la superficie cilíndrica de la zona de detección de pequeño diámetro, no lo suficiente para la adquisición deseada de otros de tales parámetros. Además, se obtuvo una variabilidad entre unidades adicional en las prestaciones ópticas como resultado de la dificultad en la alineación de tales superficies planas con el canal de flujo estirado. A la inversa, si el canal de flujo se produjera para comprender superficies planas mediante ensamblaje de componentes complementarios, la fabricación de tales células de flujo compuestas resultaría compleja de manera no práctica, requeriría mucho tiempo y sería costosa para la incorporación comercial en instrumentos citométricos, y las uniones ópticamente no homogéneas pueden restringir tales diseños mediante incursión en un patrón deseado de recogida de luz. Además, se producirán como resultado implicaciones de fiabilidad y responsabilidad durante el servicio, debido al contacto anteriormente mencionado de las uniones con el contenido operativo el canal de flujo.

60 La patente estadounidense n.º 8.189.187 concedida a Graham *et al.*, (a continuación en el presente documento, la patente '187) da a conocer un método para producir una célula de flujo óptico compuesta transparente según la porción precharacterizante de la reivindicación 1. También da a conocer una célula de flujo óptico compuesta transparente según la parte precharacterizante de la reivindicación 9. La patente '187 da a conocer diversas realizaciones y aplicaciones de células de flujo óptico monolíticas formadas a partir de una célula de flujo prismática, es decir, una estructura monolítica fabricada a partir de dióxido de silicio mediante métodos de formación de vidrio y que tiene un canal pasante formado durante ese procedimiento adecuado para contener células en una corriente de

fluido, estando dicho canal definido mediante al menos tres superficies sustancialmente planas y de longitud suficiente como para permitir la medición de características de célula mediante métodos citométricos. Se adquieren tales células de flujo prismáticas que tienen una envuelta sustancialmente cilíndrica tal como se estira coaxial con el canal pasante prismático, distinguiéndolas geoméricamente sólo dicho canal pasante y una pared más gruesa con respecto a los tubos transparentes de pared gruesa anteriormente mencionados usados en la producción de células de flujo monolíticas tal como se describe con respecto a la patente '737. Para evitar la refracción no axisimétrica inherente a tales envueltas cilíndricas, tras la recepción tales células de flujo prismáticas se mejoran proporcionándoles, mediante procedimientos de mecanizado secundario, una envuelta no cilíndrica solidaria, produciendo así las células de flujo óptico monolíticas de la patente '187. Según otras enseñanzas de la patente '187 se usan tales células de flujo monolíticas que comprenden una envuelta de sección transversal cuadrada coaxial y paralela con una porción de canal interior prismático de sección transversal similar (es decir, una versión de la célula 20' de flujo en la figura 2). Dentro del conducto de volúmetro de Coulter Z así formado, se adquieren parámetros V y C de Coulter así como señales de dispersión directa (FS) ópticas a múltiples ángulos y señales de pérdida de luz axial (ALL) sin las limitaciones funcionales anteriormente mencionadas inherentes en las células de flujo compuestas de la técnica anterior tal como se ilustran en la patente '737 y se describen en la patente '652 (por ejemplo, la célula 20 de flujo en la figura 1) o se dan a conocer en la solicitud de patente estadounidense 2007/0085997 y sus diversos precursores. Estos parámetros de caracterización citométricos permiten la distinción mejorada de cuerpos formados, y ahora se reconoce el valor clínico de diagnóstico proporcionado por estos analizadores. Además, la capacidad óptica de múltiples orificios de la solicitud de patente japonesa sin examinar n.º 62-168033 se proporciona sin la refracción no axisimétrica inherente a sus canales de flujo cilíndricos. Sin embargo, se ha encontrado que la posible variabilidad óptica que surge en los métodos de fabricación para células de flujo monolíticas puede requerir la selección del producto resultante en una etapa de procesamiento avanzada y por tanto puede limitar el rendimiento funcional de células de flujo que proporcionan parámetros de caracterización ópticos aceptables.

Se producen células de flujo prismáticas mediante métodos de formación de vidrio, descritos más completamente en la patente '187, en la que una preforma de vidrio cilíndrica relativamente grande que tiene un canal prismático interno sobredimensionado de una sección transversal poligonal deseada se calienta hasta una temperatura predeterminada a la que su viscosidad permite la deformación y el estiramiento axialmente en una torre de estiramiento convencional para reducir el canal hasta un área en sección transversal deseada. El grosor de pared de preforma necesario se logra deslizando sobre, calentando para provocar una viscosidad que permite la deformación, abatiendo sobre y fusionando a un primer tubo de sílice, que se hace que tenga la sección transversal de canal deseada mediante calentamiento para provocar una viscosidad que permite la deformación y abatimiento de dicho tubo sobre un mandril que tiene la geometría de canal deseada, un segundo tubo cilíndrico más grande de diámetros interno y externo apropiados (un tubo de revestimiento) para aumentar sin interrupciones el grosor de pared de la preforma. Tal etapa de revestimiento se repite con tubos de revestimiento adicionales de diámetros internos y externos crecientes apropiados hasta que el grosor de pared de preforma proporcione un grosor de pared de célula de flujo deseado tras estirarse la preforma para proporcionar el área en sección transversal de canal deseada y se mecaniza la preforma estirada para producir la envuelta deseada de una célula de flujo monolítica. Cada uno de los diversos tubos anteriormente mencionados es preferiblemente una forma de sílice ( $\text{SiO}_2$ ), lo más preferiblemente sílice amorfa sintética, y cada uno de los diversos ciclos de calentamiento produce una viscosidad en el intervalo de entre  $60 \times 10^5$  ( $60 \times 10^6$ ) y  $1 \times 10^5$  Pa·s ( $1 \times 10^6$  poise), más preferiblemente entre  $28 \times 10^5$  ( $28 \times 10^6$ ) y  $3 \times 10^5$  Pa·s ( $3 \times 10^6$ ) poise. Tal procedimiento de revestimiento puede dar como resultado un rendimiento reducido de células de flujo funcionales mediante cuatro posibles artefactos que pueden surgir en uno o más de los ciclos de revestimiento: a) pueden atraparse burbujas de aire entre la preforma en crecimiento y el siguiente tubo de revestimiento, estirándose posteriormente al interior de líneas de aire en una pared entre el canal de flujo y una superficie de envuelta (por ejemplo, respectivamente Z y 50 en la figura 2) de una célula de flujo acabada que pueden interferir con la adquisición de parámetros ópticos; b) puede perderse concetricidad de las sucesivas superficies exteriores de la preforma en crecimiento con el eje de canal, mediante lo cual trayectorias ópticas que se originan en la intersección del canal y los ejes ópticos se encuentran con perfiles de refracción a través de la pared de una célula de flujo acabada que dependen de su ángulo con respecto al eje óptico; c) la preforma en crecimiento puede ablandarse suficientemente de modo que superficies de pared del canal de flujo interno (por ejemplo, Z en la figura 2) pierden su planitud necesaria, provocando así diferencias aleatorias inferiores a la longitud de onda en la longitud de trayectoria óptica a través de una pared acabada que pueden producir efectos de refracción y dispersión limitantes en los parámetros ópticos adquiridos; y d) la fragilidad efectiva de la preforma puede aumentar al aumentar la tendencia a formación de astillas durante el procesamiento de la preforma estirada para dar células de flujo prismáticas o de tales células de flujo para dar células de flujo monolíticas de la patente '187. Cada uno de tales posibles artefactos de formación de vidrio pueden variar a lo largo de la longitud de la preforma estirada, provocando por tanto variabilidad entre unidades en los parámetros ópticos adquiridos a partir de diferentes células de flujo monolíticas así como en los adquiridos a través de paredes individuales de una célula de flujo específica (por ejemplo, 20' en la figura 2). Además, el rendimiento de células de flujo monolíticas procesadas de la manera anteriormente mencionada para comprender conductos de volúmetro de Coulter puede reducirse significativamente mediante formación de astillas en orificios de volúmetro críticos.

La envuelta no cilíndrica solidaria de células de flujo monolíticas según la patente '187 se forma directamente sobre al menos una porción de células de flujo prismáticas mediante procedimientos de mecanizado secundario. Además de los artefactos de formación de vidrio anteriormente mencionados, artefactos de mecanizado también pueden



afectar adversamente a los parámetros de caracterización citométricos ópticos proporcionados por una célula de flujo acabada. Como primer ejemplo de tales artefactos, puede producirse un ángulo de cuña (es decir, a en la figura 2) en la pared de célula de flujo entre cualquier superficie plana mecanizada en una célula de flujo prismática (por ejemplo, 50 en la figura 2) y las superficies sustancialmente planas correspondientes del canal prismático formado en la operación de estiramiento de vidrio (por ejemplo, Z en la figura 2). Para células de flujo óptico que incluyen conductos de volúmetro de Coulter tal como se describen en la patente '187, las pequeñas anchuras de conducto W' (por ejemplo, 52 micrómetros) hacen que controlar tal ángulo de cuña hasta una tolerancia deseada sea difícil durante la formación de la envuelta de célula de flujo mediante procedimientos disponibles, y aunque el radio interno R en las esquinas sin unión del canal de flujo Z es hidrodinámicamente ventajoso, reduce adicionalmente el alcance de W' que está disponible como referencia de alineación. Como alternativa preferible, la patente '187 enseña mecanizar una parte plana sobre la superficie cilíndrica del tubo de revestimiento final, paralela a una superficie plana del canal, antes de estirar la preforma de manera que tales preformas aplanadas tienen una sección transversal que es sustancialmente circular, es decir, son sustancialmente cilíndricas. Tales partes planas permiten un control mejorado sobre el ángulo de cuña de pared cuando se usan como referencia durante las primeras etapas de los procedimientos de formación de envuelta secundarios; sin embargo, controlar el ángulo de cuña de preforma entre tales partes planas y una superficie de canal hasta menos de aproximadamente dos grados de ángulo requiere una atención excepcional, introduciéndose variabilidad adicional mediante técnicas de montaje de células de flujo típicas usadas durante la formación secundaria de superficies de envuelta. Aunque se permiten coeficientes de variación aceptables en los parámetros caracterizantes laterales (por ejemplo, tales como dispersión lateral SS y fluorescencia F a partir de la célula BC2 de sangre en la figura 2), pequeñas variaciones en el ángulo de cuña de pared entre superficies de canal y de envuelta correspondientes pueden producir coeficientes de variación desventajosos en otros parámetros, tales como pérdida de luz axial (ALL) y dispersión directa de ángulo bajo FS, que se adquieren cerca del eje óptico OA del conjunto de transductor. Como otro ejemplo de artefactos de mecanizado, la generación de una superficie no cilíndrica de revolución (por ejemplo, esférica) para proporcionar tal superficie de envuelta no cilíndrica en una porción de una preforma estirada requiere que tal porción esté centrada en un eje que tiene una relación deseada con respecto al eje de canal de flujo y el uso, por ejemplo, de una herramienta de conformación, dependiendo por consiguiente la geometría de envuelta de la precisión y el uso del método de conformación. Incluso diferencias inferiores a la longitud de onda en la longitud de trayectoria óptica entre el canal de flujo y una superficie de envuelta formada mediante mecanizado secundario pueden producir efectos de refracción y dispersión que limitan la calidad de los parámetros de caracterización ópticos y complican la alineación de la célula de flujo acabada durante la integración en un conjunto de transductor. Tales artefactos ópticos que se originan en artefactos de mecanizado también pueden producirse no sólo de una unidad a otra para la célula 20' de flujo de la figura 2, sino también para paredes individuales de una célula 20' de flujo específica.

Pueden eliminarse efectos ópticos inaceptables de la variabilidad en la fabricación anteriormente mencionada que surgen tanto en la formación de vidrio como en el mecanizado secundario mediante selección de células 20' de flujo monolíticas. Los conjuntos de transductor que comprenden células 20' de flujo seleccionadas para proporcionar prestaciones óptimas a lo largo del eje óptico OA de la figura 2 proporcionan parámetros caracterizantes con calidad de diagnóstico excepcional, y determinados analizadores de hematología incorporan tales conjuntos que han sobrevivido a múltiples selecciones de este tipo. Sin embargo, la necesidad de algún procedimiento de selección de este tipo puede no resultar evidente hasta que pueda someterse a pruebas funcionales una célula 20' de flujo monolítica en un conjunto de transductor parcial; la reelaboración de una célula 20' de flujo o de un conjunto de transductor parcial que dan prestaciones inaceptables añade costes desventajosos, así como reduce los rendimientos tanto de células de flujo como de componentes de transductor útiles.

Independientemente del diseño, las células de flujo que permiten la adquisición de parámetros de caracterización ópticos aceptable a partir de cuerpos formados esféricos demuestran una mayor variación en tales parámetros adquiridos a partir de cuerpos formados que carecen de forma al menos casi esferoide. Si son significativamente asimétricos, tales cuerpos formados transitan normalmente por la zona de adquisición de parámetros de una célula de flujo con su dimensión mayor sustancialmente alineada con el eje de flujo de muestra, pero con orientación aleatoria alrededor de dicho eje (es decir, el perfil lateral presentado en el eje de adquisición es aleatorio con respecto al eje de flujo). Numerosos cuerpos formados de interés clínico son asimétricos, y su orientación rotacional aleatoria produce coeficientes de variación desventajosos en los parámetros caracterizantes ópticos adquiridos, con coeficientes de variación aumentados consiguientes en sus datos de subpoblación. Se sabe que canales de flujo que tienen una sección transversal rectangular orientan de manera preferente glóbulos rojos discoides fijos introducidos a través de un tubo de entrada de muestra axisimétrico (Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 25:774-778, 1977), y esta configuración se ha usado en células de flujo para la adquisición de imágenes celulares (por ejemplo, patentes estadounidenses n.ºs 5.088.816; 5.412.466; y 5.825.477). Las boquillas no axisimétricas en tubos de entrada de muestra (por ejemplo, tal como en la patente estadounidense n.º 5.825.477 anteriormente mencionada) y las puntas biseladas de manera apropiada de un tubo de entrada axisimétrico generan tales fuerzas de rotación de orientación; estas últimas se han usado en conjuntos de transductor experimental para obtener señales S a partir de glóbulos rojos discoides fijos orientados (Biophysical Journal, 13:1-5, 1978) o señales F a partir de espermatozoides separados orientados (Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 27:353-358, 1979; Cytometry, 7:268-273, 1986). Coeficientes de variación reducidos en los parámetros de caracterización ópticos adquiridos, con la consiguiente clasificación mejorada de cuerpos formados en subpoblaciones, hacen deseables conjuntos de transductor que aplican tales fuerzas de rotación de orientación a cuerpos formados asimétricos en

muestras.

El documento US 2004/0086216 da a conocer una célula de flujo de fibra óptica. La célula de flujo puede tener un diseño modular que proporciona un kit de célula de flujo que puede ensamblarse para formar células de flujo personalizadas.

El documento US 2005/0180885 da a conocer una cubeta de célula de flujo de recubrimiento que comprende una porción de cámara compuesta por una resina y una porción de orificio compuesta por un material de vidrio. Se proporciona una estructura de enganche para evitar que la porción de orificio se desplace con respecto a la porción de cámara, permitiendo por tanto mantener una condición de flujo laminar entre el fluido de suspensión celular y el fluido de recubrimiento.

El documento US 2010/0118298 da a conocer un cuerpo de célula de flujo que comprende un canal de flujo, acoplado al cuerpo de célula de flujo, que funciona para conducir y enfocar fluido de muestra a través de una zona de interrogación; y una sonda de inyección de muestra, acoplada de manera extraíble al cuerpo de célula de flujo, que funciona para proporcionar un flujo uniforme de fluido de muestra al canal de flujo.

El documento US 5.690.895 da a conocer un aparato de célula de flujo que comprende un líquido de muestra, un dispositivo de suministro, un dispositivo de suministro de líquido de recubrimiento, una célula de flujo y una boquilla. El paso de flujo de la célula de flujo y la boquilla están formados de modo que garantizan un flujo de líquido de muestra de una anchura fija a través de la porción de medición, incluso a una alta velocidad de flujo.

En resumen, conjuntos de transductor que comprendan células de flujo óptico que tengan no sólo las ventajas anteriormente mencionadas de células de flujo monolíticas tal como se comenta en la patente '187, sino también que permitan rendimientos mejorados con menos selección desde la producción hasta la integración en conjuntos de transductor que funcionan de manera aceptable, facilitarán ventajosamente la adquisición de los diversos parámetros de distinción usados por analizadores de hematología y citómetros de flujo automatizados para diferenciar y caracterizar diversos cuerpos formados en muestras líquidas. Conjuntos de transductor que comprendan tales células de flujo que tengan una sección transversal de canal de flujo formada de modo que se aplique una fuerza de orientación a cuerpos formados que presentan perfiles asimétricos cuando pasan a través de la porción de adquisición de parámetros de las mismas, o bien por separado o bien en combinación con un tubo de entrada de muestra formado de manera que se aplique una fuerza de orientación a tales cuerpos formados, reducirán ventajosamente la variabilidad en los parámetros de caracterización citométricos ópticos adquiridos durante el procedimiento de transducción en tales analizadores de cuerpos formados.

**Breve resumen de la invención**

Realizaciones a modo de ejemplo tal como se describen y se reivindican en el presente documento se basan en el hallazgo de que, al proporcionar canales de flujo y envueltas en componentes independientes de material transparente aislante, puede lograrse un control mejorado tanto sobre la calidad de superficies de pared de canal de flujo como sobre la alineación de superficies de envuelta con respecto a superficies de canal de flujo de células de flujo compuestas que comprenden tales componentes, mediante lo cual los parámetros de caracterización ópticos adquiridos a través de la pared de tales células de flujo se vuelven más sistemáticos, la selección de células de flujo aceptables puede realizarse a un nivel de integración significativamente menor en un conjunto de transductor, y pueden obtenerse reducciones ventajosamente significativas de costes y mejora de rendimientos tanto de células de flujo como de conjuntos de transductor.

A la vista de la discusión anterior, un objetivo de esta invención es proporcionar un método mejorado para producir células de flujo óptico para la caracterización por citometría de flujo de cuerpos formados en una muestra líquida, ofreciendo dicho método una reducción ventajosamente significativa de costes y rendimientos mejorados proporcionando dos elementos de material transparente aislante, el primero un elemento monolítico sustancialmente cilíndrico que rodea un canal de flujo interior sin interrupciones al menos una porción axial del cual está rodeada por una superficie continua de sección transversal preferiblemente no circular y teniendo el segundo elemento tanto una superficie cóncava adaptada a tal primer elemento como una envuelta óptica no cilíndrica exterior de forma y orientación predeterminadas con respecto a tal superficie cóncava, ensamblando dichos elementos de modo que tal superficie cóncava de dicho segundo elemento puede posicionarse con respecto a, y unirse a, dicho primer elemento, y uniendo ópticamente dicho segundo elemento a dicho primer elemento para formar una célula de flujo compuesta que tiene una relación espacial fija deseada entre una característica de referencia del primer elemento y una característica de referencia del segundo elemento mediante lo cual se minimizan efectos de refracción no axisimétricos sobre parámetros caracterizantes ópticos adquiridos a partir de cuerpos formados que pasan a través de dicho canal de flujo.

Todas las características de los sistemas descritos son aplicables a los métodos descritos cambiando lo que sea necesario, y viceversa.

En un aspecto, realizaciones de la presente invención abarcan métodos para producir una célula de flujo óptico

5 compuesta transparente del tipo usado para caracterizar cuerpos formados que pasan a través de la célula de flujo, teniendo la célula de flujo óptico formado en la misma un canal de flujo interno rectilíneo. En particular, según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir una célula de flujo óptico compuesta transparente, según la reivindicación 1. La invención también se extiende a una célula de flujo óptico compuesta transparente según la reivindicación 9.

10 Realizaciones de la presente invención y sus diversas ventajas se apreciarán mejor a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones a modo de ejemplo, haciéndose referencia a los dibujos adjuntos, en los que caracteres de referencia similares indican partes similares y en los que, para claridad, todos los pasos de muestra internos se muestran aumentados y desproporcionados con respecto a las envueltas externas de componentes en los que están comprendidos.

**Breve descripción de los dibujos**

15 La figura 1 ilustra una vista en sección transversal a través de la zona de adquisición de parámetros prismática de una célula de flujo óptico compuesta de la técnica anterior a modo de ejemplo que comprende componentes complementarios unidos que tienen las uniones expuestas al flujo de líquido y corrientes de excitación de Coulter dentro del canal de flujo;

20 la figura 2 ilustra una vista en sección transversal a través de la zona de adquisición de parámetros prismática de una célula de flujo monolítica de la técnica anterior a modo de ejemplo que contiene el flujo de líquido y corrientes de excitación de Coulter dentro de un canal de flujo sin uniones y evita las muchas desventajas de las células de flujo compuestas;

25 la figura 3 es una ilustración esquemática de las porciones de procesamiento de muestra y de adquisición de datos de un citómetro de flujo que incorpora una realización preferida de una célula de flujo óptico compuesta de cuatro lados diseñada y fabricada según el método de la presente invención;

30 la figura 4 es una ilustración en perspectiva de la célula de flujo óptico compuesta usada en la instrumentación de la figura 3 para adquirir parámetros caracterizantes tanto ópticos como al menos uno del volumen (V) y la conductividad (C) de Coulter de cuerpos formados que pasan a través de la zona de adquisición de parámetros prismática de un canal de flujo sin uniones que contiene el flujo de líquido y corrientes de excitación de Coulter;

35 las figuras 5 y 6 ilustran vistas en sección longitudinal y transversal de la célula de flujo óptico compuesta cuadrada mostrada en la figura 4, incluyendo la figura 5 el eje de célula de flujo y tomándose la figura 6 en un plano a través de la zona de adquisición de parámetros de cuatro lados que incluye el eje óptico de excitación;

40 las figuras 7A y 7B ilustran células de flujo óptico compuestas de cuatro lados fabricadas según el método de la invención y que proporcionan únicamente parámetros caracterizantes ópticos;

las figuras 8A y 8B ilustran dos etapas de un procedimiento preferido para producir una preforma del tipo usado en la producción del elemento monolítico cilíndrico de células de flujo óptico compuestas de la invención;

45 la figura 9 es una ilustración en perspectiva de una célula de flujo óptico compuesta de seis lados que se produce fácilmente mediante el método de fabricación de la invención y es útil en otra realización de la instrumentación de la figura 3;

50 la figura 10 ilustra una vista en sección transversal a través de la zona de adquisición de parámetros de seis lados de la célula de flujo óptico compuesta de la figura 9 y un modo de uso;

55 la figura 11 es una ilustración esquemática de las porciones de procesamiento de muestra y de adquisición de datos de un citómetro de flujo que se basa únicamente en propiedades ópticas de cuerpos formados para diferenciar subpoblaciones de los mismos, en el que se adquieren parámetros de distinción a partir de cuerpos formados que transitan por la zona de adquisición de parámetros hexagonal de la célula de flujo óptico compuesta ilustrada en la figura 10;

las figuras 12, 13A-13C, 14 y 15 ilustran diversas vistas de otras células de flujo óptico compuestas producidas mediante el método de la invención;

60 las figuras 16A y 16B ilustran tubos de introducción de muestra a modo de ejemplo para su uso en conjuntos de transductor que comprenden células de flujo óptico;

65 la figura 17 es una ilustración esquemática de un conjunto de transductor citométrico, los flujos de muestra y recubrimiento a través de la célula de flujo del mismo se regulan mediante tubos de introducción de muestra y de restrictor de recubrimiento según la invención; y

las figuras 18A y 18B ilustran tubos de introducción y salida de muestra para su uso en conjuntos de transductor, comprendiendo dichos tubos elementos de electrodo para la adquisición de parámetros caracterizantes de volumen (V) y/o conductividad (C) de Coulter de cuerpos formados que pasan a través de la zona de adquisición de parámetros de una célula de flujo.

5

### Descripción detallada de la invención

Los analizadores de hematología y otros citómetros de flujo adquieren datos importantes desde el punto de vista de diagnóstico a partir de muestras de líquidos corporales de pacientes que contienen diversos cuerpos formados o partículas, y se han desarrollado muchas realizaciones diferentes. Estos instrumentos comprenden diversos componentes que están acoplados por conexión de fluido para contener muestras de pacientes para la caracterización de cuerpos formados en las mismas, adquirir parámetros caracterizantes citométricos específicos a partir de dichos cuerpos particulados, y dirigir muestras analizadas y fluidos de purga a receptáculos apropiados. Todos incorporan una célula de flujo óptico a través de un paso interno de la cual pueden hacerse pasar tales muestras tras someterse a diversos protocolos de preparación y en las que pueden detectarse diversas propiedades de los cuerpos particulados, mediante lo cual los diversos tipos de subpoblaciones de cuerpos formados en las mismas pueden diferenciarse y numerarse y los parámetros derivados pueden procesarse y correlacionarse para proporcionar diagnósticos deseados. A continuación en el presente documento se entenderá que una célula de flujo óptico puede incluir o puede estar limitada a incluir sólo: a) uno o más elementos fabricados a partir de material transparente aislante; b) un paso pasante interior en uno de dichos elementos al menos una porción axial del cual permite la detección de características de cuerpos formados mediante métodos citométricos en una zona de adquisición de parámetros; y c) una envuelta externa sobre al menos un elemento, una superficie de la cual forma con tal paso al menos una pared de una zona de adquisición de parámetros a través de la cual puede hacerse que un haz de interrogación de radiación óptica interaccione con cuerpos formados que transitan por tal zona de adquisición de parámetros, mediante lo cual pueden detectarse una o más de las propiedades de absorción óptica, dispersión de luz y fluorescencia de tales cuerpos a través de una o más de otras de tales paredes; en este caso, "aislante" significa que no conduce la electricidad, y "transparente" significa que transmite fácilmente radiación óptica, por ejemplo, luz. Tal como se indicó en la parte de introducción del presente documento, es preferible que se minimicen efectos de refracción no axisimétricos en la superficie de envuelta externa de tales células de flujo y lo más preferible que se minimicen tales efectos en superficies tanto de la envuelta externa como de la porción de adquisición de parámetros, o de detección, porción de tal paso. En células de flujo para la adquisición de parámetros caracterizantes simplemente ópticos tal paso tiene normalmente una sección transversal uniforme mayor de aproximadamente 150 micrómetros de anchura. Sin embargo, los instrumentos que incorporan la adquisición simultánea de parámetros ópticos y de volumen de CC (V) y/o conductividad eléctrica de RF (C) de Coulter a partir de un cuerpo formado individual también requieren que la zona de adquisición de parámetros sea una constricción, o conducto de volúmetro, en el paso interno; tales conductos de volúmetro tienen normalmente menos de 100 micrómetros de anchura y entre 0,75 y 2,0 veces su anchura de longitud. Ejemplos de estas últimas células de flujo y de analizadores de hematología que las usan se dan a conocer más completamente en las patentes estadounidenses n.ºs 5.125.737 y 6.228.652 legalmente cedidas, anteriormente mencionadas. En resumen, tales analizadores funcionan para detectar, diferenciar y contar automáticamente diversos tipos de cuerpos formados (por ejemplo, glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, etc.) contenidos en diferentes muestras de líquidos corporales de pacientes y para notificar sus hallazgos.

Haciendo ahora referencia a los dibujos, las porciones de manipulación de muestra y de adquisición de datos de un analizador CA de hematología a modo de ejemplo se ilustran esquemáticamente en la figura 3, mientras que tales porciones de un citómetro CA' de flujo a modo de ejemplo se muestran de manera similar en la figura 11. El analizador CA de la figura 3 emplea la detección simultánea de parámetros caracterizantes ópticos y de V y/o C de Coulter a partir de cuerpos formados individuales en tales muestras, mientras que el citómetro CA' de la figura 11 sólo detecta parámetros ópticos de tales cuerpos formados. Los instrumentos ilustrados en las figuras 3 y 11 se distinguen de los instrumentos de la técnica anterior porque comprenden un conjunto T o T' de transductor respectivo que está estructurado según la presente invención; T o T' comprenden, de manera individual o en combinación, una célula 30 ó 30" de flujo y/o un tubo 56 de entrada de muestra, ambos de los cuales están estructurados y fabricados según otros aspectos de la presente invención. La célula 30 ó 30" de flujo es el componente central del conjunto T o T' de transductor respectivo que funciona para interrogar cada cuerpo formado en una muestra preparada a medida que pasan a través de la zona Z o Z" de adquisición de parámetros en una corriente desde el tubo 56 de entrada. Dichas células de flujo están unidas de manera sellada a elementos 34 y 35 de tapa del conjunto T de transductor de la figura 3 o el conjunto T' de transductor de la figura 11 respectivos, elementos que, mediante su geometría interna, definen cámaras, y están acoplados por conexión de fluido en un extremo a la cámara interna en el elemento 34 de tapa y en el otro extremo a una cámara similar en el elemento 35 de tapa. Los elementos 34 y 35 de tapa están montados en una estructura de soporte, no mostrada en las figuras 3 u 11, y están dotados de una pluralidad respectiva de orificios P1-P6 en la figura 3 y P1, P2 y P4 en la figura 11. Dichos orificios están acoplados por conexión de fluido a dichas cámaras internas y sirven para: 1) introducir en la célula 30 ó 30" de flujo una o más muestras preparadas que van a analizarse a través del orificio P1 y el tubo 56 de entrada y un líquido S1 de recubrimiento a través del orificio P2; 2) drenar muestra(s) que sale(n) y líquido de recubrimiento al residuo; 3) purgar una o ambas cámaras internas en los elementos 34 y 35 de tapa al residuo; y 4) proporcionar un vacío para preparar los tubos que proporcionan suministro a los diversos orificios. Se apreciará que

65

pueden implementarse conjuntos de transductor que tienen funcionalidad similar de una variedad de formas, por ejemplo, la inyección de muestra a través de la boquilla de múltiples orificios de la patente '652 puede ser útil en determinadas realizaciones. Tal como se comentará, los conjuntos de transductor pueden estructurarse de otra manera para proporcionar función citométrica potenciada.

5 Los conjuntos T y T' de transductor están soportados mediante un sistema de manipulación de muestra acoplado por conexión de fluido e interaccionan con diversos componentes del módulo 18 ó 18' de transductor en el instrumento CA de la figura 3 o el instrumento CA' de la figura 11 respectivos para detectar parámetros caracterizantes de los diversos cuerpos formados en una muestra de paciente. Las muestras de paciente (por ejemplo, muestras de sangre completa WBS) se presentan a tales instrumentos en diferentes tubos de ensayo o viales 10 que pueden moverse dentro del instrumento mediante un transporte ST de muestra. Con la presentación de tales viales a una sonda P de aspiración, se aspira un volumen de muestra predeterminado a partir de cada uno. Cada muestra aspirada se segmenta mediante una válvula 12 de toma de muestras de sangre convencional para producir una pluralidad de alícuotas (por ejemplo, A1-A3) que después se dispensan a diferentes cámaras de mezclado (por ejemplo, MC1-MC3) dentro de un componente 14 de preparación de muestra del analizador. Mientras están en las cámaras de mezclado, cada alícuota se mezcla con uno o más reactivos (por ejemplo, R1-R7) adaptados para reaccionar de manera selectiva con y/o diluir determinados tipos de cuerpos formados en la muestra. El componente 14 de preparación de muestra puede producir, por ejemplo, una muestra SL sometida a lisis y teñida que comprende predominantemente glóbulos blancos y otras células (por ejemplo, glóbulos rojos nucleados) que se han teñido con un colorante fluorescente; una muestra SD diluida y teñida que contiene todos los tipos de células sanguíneas en una suspensión altamente diluida, estando algunas de tales células (por ejemplo, el subconjunto de reticulocitos) teñidas con un colorante fluorescente; y una muestra S<sub>T</sub> sometida a lisis y marcada que comprende predominantemente glóbulos blancos en una suspensión, incluyendo glóbulos blancos seleccionados (por ejemplo, células positivas para CD4 o CD8) que se han teñido o marcado de otro modo, por ejemplo, mediante un anticuerpo monoclonal, con un fluorocromo o partícula fluorescente. Después se seleccionan volúmenes dosificados con precisión de cada muestra preparada, tal como se proporcionan mediante un mecanismo 16 dosificador (16' en la figura 11), mediante una válvula DV de distribución convencional y se bombean (por ejemplo, mediante bombas MP1, MP2 o MP3 dosificadoras) a través del orificio P1 de entrada de muestra al tubo 56 de entrada de muestra del conjunto T o T' de transductor. El tubo 56 de entrada de muestra funciona para regular y dirigir el flujo de muestra inyectado en líquido de recubrimiento en la cámara dentro del elemento 34 de tapa. La bomba MP4 dosificadora proporciona líquido de recubrimiento SF como S1 a los orificios P2 de dichos conjuntos de transductor para mantener un diferencial de presión predeterminado entre las cámaras dentro de los elementos 34 y 35 de tapa y centrar de manera hidrodinámica flujos de muestra desde el tubo 56 de entrada hacia arriba a través de la zona Z o Z" de adquisición de parámetros respectiva en la célula 30 ó 30" de flujo al residuo a través del tubo 58 de salida y el orificio P4. La disposición de manipulación de muestra descrita hasta aquí es común a las realizaciones de la figura 3 y la figura 11, pero los expertos en la técnica citométrica entenderán que pueden usarse otras configuraciones fluidas para preparar y suministrar muestras de paciente a través del orificio P1 y el tubo 56 de entrada a la célula 30 ó 30" de flujo para la adquisición de parámetros de diferenciación de los cuerpos formados en la misma.

40 A medida que las muestras salen de manera individual del tubo 56 de entrada y fluyen a través de la zona Z o Z" de adquisición de parámetros de la célula 30 ó 30" de flujo respectiva en las figuras 3 y 11, se detectan simultáneamente determinadas propiedades ópticas de cuerpos formados individuales u otras partículas en las mismas y se convierten en señales eléctricas como resultado de la interacción con radiación óptica, por ejemplo, haz de láser B tal como se muestra en los módulos 18 ó 18' de transductor respectivos. Las señales derivadas de este modo se producen como pulsos eléctricos y son parámetros de la absorción de radiación (A) de cada cuerpo formado, sus diversas propiedades de dispersión de luz (S) [es decir, dispersión directa (FS), dispersión lateral (SS) y/o retrodispersión (BS)], y sus propiedades de fluorescencia (F). En la figura 3, también se determinan simultáneamente el volumen V y/o la conductividad de RF C de Coulter como pulsos mediante electrodos 38 y 40 en contacto de fluido en las cámaras respectivas de los elementos 35 y 34 de tapa, estando dichos electrodos convencionales conectados por conducción al circuito 41 de CC/RF. Diversas combinaciones de tales señales se procesan mediante componentes de citómetro convencionales, tal como se dan a conocer en la patente '652 pero no se muestran en las figuras 3 u 11, para proporcionar información apropiada para la correlación mediante algoritmos que proporcionan información de diagnóstico deseada. Tal como apreciarán los expertos en la técnica citométrica, las figuras 3 y 11 ilustran tan sólo dos de la amplia variedad de módulos de transductor adecuados para la adquisición de tales señales.

60 Los diferentes enfoques de detección usados en los módulos 18 y 18' de transductor respectivos de las figuras 3 y 11 requieren diferente soporte de manipulación de muestra para los conjuntos T o T' de transductor en los instrumentos CA y CA'. La zona Z de adquisición de parámetros en la célula 30 de flujo de la figura 3 está definida por el conducto de volúmetro de Coulter en la misma, que debido a su pequeña sección transversal normalmente requiere un estrecho control de la presión diferencial entre los elementos 34 y 35 de tapa durante la adquisición de parámetros, con purga rigurosa de estas cámaras después de eso. Para minimizar la recirculación de cuerpos formados de vuelta al campo eléctrico ambiental del conducto Z de volúmetro y para mantener un diferencial de presión predeterminado a través del conducto de volúmetro, la bomba MP5 dosificadora en el mecanismo 16 dosificador proporciona al orificio P5 del elemento 35 de tapa líquido de recubrimiento SF como S2, que sale del

5 orificio P4; el volumen mayor de S2 suministrado de este modo durante la fase de purga también sale del orificio P6; el elemento 34 de tapa se purga con SF suministrado como S1 mediante la bomba MP4 dosificadora a través del orificio P2, saliendo el residuo del orificio P3. (Puede facilitarse una compresión de lo mismo mediante un examen de las figuras 16 y 18A-B más detalladas). Para aplicaciones que no requieren parámetros caracterizantes V y/o C de Coulter, una de las células 30' simplemente de flujo óptico en la figura 7A o la figura 7B, de sección transversal apropiada en el paso 32', puede remplazar a la célula 30 de flujo en la figura 3; la ausencia de un conducto de volúmetro en la célula 30' de flujo elimina la necesidad de electrodos 38 y 40 respectivos en los elementos 35 y 34 de tapa y el circuito 41 de CC/RF, pero requiere modificación de los demás componentes del módulo 18 ó 18' de transductor relacionados con la adquisición de los diversos parámetros caracterizantes ópticos. Tal como se indica en la figura 11, los pasos de muestra típicos más grandes en tales células simplemente de flujo óptico pueden permitir la eliminación de otros constituyentes de la figura 3 (por ejemplo, la bomba MP5 dosificadora en el mecanismo 16 dosificador y los orificios P3, P5 y P6 del conjunto T de transductor). Tal como resultará evidente para los expertos en esta técnica, pueden usarse otras disposiciones de fluido para mover muestras preparadas a través de la zona Z o Z" de adquisición de parámetros de la célula 30 ó 30" de flujo en el conjunto T o T' de transductor y a un receptáculo de residuo para su eliminación apropiada.

15 Las células de flujo óptico, por ejemplo, la célula 30 de flujo de la figura 3 o la célula 30" de flujo de la figura 11, pueden no sólo constituir un elemento importante en los conjuntos de transductor tales como T o T', sino también determinar la calidad global de los parámetros caracterizantes resultantes del procedimiento de transducción. Tal como se revisó en la parte de introducción del presente documento, la refracción no axisimétrica en las superficies interior y exterior de paredes de célula de flujo impone una limitación significativa sobre la calidad de tales parámetros; tal como se comenta en la patente '187, las células de flujo óptico prismáticas sin uniones minimizan los efectos de refracción no axisimétricos en la superficie de paso de flujo de la zona de adquisición de parámetros. Tales células de flujo prismáticas son una estructura monolítica fabricada preferiblemente a partir de SiO<sub>2</sub> mediante métodos de formación de vidrio y que tienen un canal pasante formado durante ese procedimiento adecuado para contener células en una corriente de fluido, estando dicho canal definido mediante al menos tres superficies sustancialmente planas y de longitud suficiente como para permitir la medición de características de célula mediante métodos citométricos. Debido a la diferencia de refracción entre paredes de célula de flujo y el aire circundante, para muchas aplicaciones citométricas la envuelta cilíndrica de tales células de flujo da como resultado efectos de refracción no axisimétricos inaceptables. La patente '187 enseña la formación de una envuelta no cilíndrica solidaria sobre células de flujo prismáticas, mediante lo cual pueden minimizarse los efectos de refracción no axisimétricos en las superficies de pared tanto interior como exterior de células de flujo monolíticas. Los artefactos de procedimientos de formación de vidrio y de mecanizado usados para fabricar células de flujo monolíticas se indicaron en la parte de introducción del presente documento, al igual que las consecuencias desventajosas de tales artefactos durante el procesamiento y la integración de tales células de flujo en conjuntos de transductor aceptables. En la primera columna de datos de la tabla 1 se resumen detalles de fabricación y estructura para una célula de flujo monolítica a modo de ejemplo.

20 Tabla 1. Comparación de una célula de flujo monolítica según el método de la patente '187 y una célula de flujo compuesta según el método descrito en el presente documento. Ambas células de flujo a modo de ejemplo se basan en células de flujo prismáticas que tienen un canal de flujo de cuatro lados de 52 micrómetros entre superficies opuestas y radios de esquina de 10 micrómetros; se suponen envueltas cuadradas que tienen superficies planas de al menos 4,2 mm de anchura. El radio usado en el cálculo del radio recíproco de las superficies de pared de canal es el promedio de al menos 20 radios promediados de círculos de mejor ajuste para cada una de las cuatro superficies de pared tal como se obtienen mediante mediciones por sistemas de visión.

Parámetro	US 8.189.187	Esta solicitud
Temperatura de abatimiento y fusión, °C	de 1.610 a 1.860	de 1.610 a 1.860
Viscosidad de abatimiento y fusión, x 10 <sup>5</sup> Pa·s (x 10 <sup>6</sup> poise)	de 60 a 1	de 60 a 1
Tubos de revestimiento en preforma prismática	5	3
Temperatura de estiramiento de preforma, °C	de 1.610 a 1.860	de 1.500 a 1.750
Viscosidad de estiramiento de preforma, x 10 <sup>5</sup> Pa·s (x 10 <sup>6</sup> poise)	de 60 a 1	de 1.000 a 6
Radio recíproco que abarca 28 micrómetros, mm <sup>-1</sup>	0,30	0,19
Estructura de célula de flujo acabada	Monolítica; figura 2	Compuesta; figura 6
¿Contenido de canal de flujo en contacto con unión?	No; sin uniones.	No; unión externa.
Envuelta de célula de flujo	Solidaria, mecanizada	Independiente
Alineación de canal de flujo con respecto a envuelta	Fijada mediante mecanizado	Ajustable

25 Las desventajas comerciales anteriormente mencionadas de células de flujo monolíticas se abordan en el presente documento mediante células de flujo compuestas fabricadas según un método de la presente invención. Tal como demostrará la siguiente discusión de la tabla 1, tal método comprende mejoras en la técnica de células de flujo prismáticas, se distingue de otros métodos para producir células de flujo, distingue el producto del mismo de otras células de flujo incluyendo células de flujo monolíticas, y es generalmente aplicable a una amplia variedad de

realizaciones de célula de flujo que conservan las muchas ventajas citométricas demostradas de las células de flujo monolíticas al tiempo que reducen la probabilidad de los artefactos anteriormente mencionados a los que es propenso su método de fabricación. Tal método ofrece ventajosamente costes reducidos y rendimientos mejorados proporcionando al menos dos elementos independientes, que se adaptan mutuamente, alineables, fabricados a partir de material transparente aislante, ensamblándose entonces y fijándose los elementos entre sí en una relación predeterminada para formar una célula de flujo que tiene una estructura compuesta a través de la cual pueden determinarse parámetros ópticos de cuerpos formados que transitan por un canal de flujo interno (por ejemplo, la célula 30 de flujo en las figuras 3-6). Un primer elemento (por ejemplo, 31 de la célula 30 de flujo en las figuras 4-6) es un elemento monolítico sustancialmente cilíndrico que rodea un paso interior sin interrupciones (es decir, 32 en las figuras 4 y 5), al menos una porción axial del cual (es decir, el conducto Z de volúmetro en dichas figuras) está rodeada por una superficie continua de sección transversal preferiblemente no circular (es decir, Z en la figura 6) para formar una zona de adquisición de parámetros (es decir, Z en las figuras 3-6). Tales elementos se fabrican preferiblemente como células de flujo prismáticas mediante procedimientos que difieren en aspectos clave de las descritas en la patente '187; tal como se comentará, tales elementos también comprenden menos tubos de revestimiento que las células de flujo prismáticas usadas para formar células de flujo monolíticas comparables de la patente '187. El elemento 31 de las figuras 4-6 se produce preferiblemente formando un conducto de volúmetro en una célula de flujo prismática apropiada (por ejemplo, el elemento 31' de la célula de flujo en las figuras 7A o 7B) tal como se describe en la parte de introducción del presente documento con respecto a la célula de flujo usada en determinados analizadores producidos y comercializados por Beckman Coulter, Inc. Los efectos de refracción no axisimétricos que se originan en las envueltas cilíndricas de tales células de flujo prismáticas se mejoran ópticamente en el presente documento no mecanizando una envuelta óptica solidaria sobre las mismas tal como para las células de flujo monolíticas de la patente '187, sino combinando dichas células de flujo prismáticas con al menos un segundo elemento independiente (es decir, 37 en las figuras anteriormente mencionadas) que comprende tanto una superficie cóncava que se adapta a dicho elemento monolítico (por ejemplo, una perforación pasante cilíndrica interior o porción de la misma) como una envuelta preferiblemente no cilíndrica exterior que tiene superficies ópticas (por ejemplo, partes 50 planas ópticas) de orientación predeterminada con respecto a la misma según sea adecuado para la función citométrica prevista. Dicho elemento 31 ó 31' se ensambla dentro de al menos una porción del elemento 37, estando dicha superficie de adaptación o porción de la misma posicionada con respecto a un elemento 31 ó 31', estableciéndose tal relación espacial mediante alineación de características de referencia en dichos elementos (por ejemplo, una parte 52 plana en el elemento 31 ó 31' y un lado 50 plano del elemento 37). Después se fija el elemento 37 al elemento 31 ó 31' mediante la unión 39 óptica para minimizar la refracción no axisimétrica a través de la pared de compuesto formada entre una superficie del paso 32 ó 32' respectivo en el elemento 31 ó 31' y la superficie 50 de envuelta correspondiente del elemento 37. La unión 39 se produce preferiblemente con un material de unión óptica que es tanto sustancialmente no fluorescente como ópticamente homogéneo con los elementos 31 ó 31' y el elemento 37, es decir, los índices de refracción respectivos  $n_{31}(\lambda)$  o  $n_{31'}(\lambda)$ ,  $n_{37}(\lambda)$  y  $n_{39}(\lambda)$  de los elementos 31 ó 31' y 37, y del material 39 de unión óptica, son sustancialmente iguales. La célula 30 de flujo de la figura 3 también puede producirse a partir de la célula 30' de flujo compuesta en las figuras 7A o 7B formando un conducto de volúmetro en el paso 32' de la misma de la manera anteriormente mencionada. La célula 30" de flujo en la figura 11 difiere de la célula 30 de flujo de la figura 3 por tener una sección transversal hexagonal tanto en la zona Z" de adquisición de parámetros como en la envuelta tal como se muestra en las figuras 9 y 10; su método de fabricación puede ilustrarse de manera similar mediante una descripción análoga de dichas figuras. Tanto para la célula 30 de flujo de la figura 3 como para la célula 30" de flujo de la figura 11, la estructura resultante comprende por tanto generalmente un paso interno (por ejemplo, 32 ó 32") que incluye una zona de adquisición de parámetros (por ejemplo, Z o Z") a través de la cual pueden dosificarse las muestras preparadas anteriormente mencionadas y una envuelta externa (por ejemplo, que comprende las superficies 50 ó 60) alineada con la misma que es adecuada para la adquisición de parámetros caracterizantes ópticos a partir de cuerpos formados en tales muestras a medida que transitan por dicho paso. Tal como resultará evidente para los expertos en la técnica citométrica, pueden producirse numerosas estructuras de célula de flujo compuesta distintas de las células 30, 30' y 30" de flujo a modo de ejemplo de las figuras anteriormente citadas mediante el método descrito en el presente documento.

Con referencia a la tabla 1, pueden demostrarse ventajas de células de flujo según el método de la presente invención con respecto a artefactos de formación de vidrio mediante comparación con células de flujo monolíticas similares producidas según la patente '187. Los productos típicos de ambos métodos comprenden preferiblemente un elemento monolítico sin uniones, o célula de flujo prismática, que tiene un canal de flujo sin interrupciones interno, o paso, que rodea y contiene contenido funcional del mismo y una envuelta óptica sustancialmente coaxial al mismo. Tal como se comenta en la patente '187, tal elemento monolítico se fabrica como una preforma producida a partir de un material síliceo transparente aislante que se hace que tenga un canal interior preferiblemente limitado mediante tres o más superficies planas. Tal preforma se forma abatiendo un tubo de material transparente aislante meticulosamente limpio, preferiblemente una forma de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) y lo más preferiblemente sílice amorfa sintética producida mediante un procedimiento de deposición en fase de vapor o de sol-gel, sobre un mandril no cilíndrico que tiene una sección transversal similar a la de la zona de adquisición de parámetros final deseada; tal mandril se prepara a partir de un material adecuado mediante operaciones de mecanizado convencionales para tener la sección transversal deseada significativamente más grande que tal zona tal como se conoce en la técnica de formación de vidrio. En la figura 8A, se muestra un mandril M de sección transversal cuadrada insertado dentro de un tubo T1 de sílice antes de montarse el par de tubo/mandril sobre un torno; mientras se hace rotar se calienta el

tubo por encima de su temperatura de transición (o ablandamiento) para producir una viscosidad en el intervalo de entre  $60 \times 10^5$  ( $60 \times 10^6$ ) y  $1 \times 10^5$  Pa·s ( $1 \times 10^6$ ) poise, más preferiblemente entre  $28 \times 10^5$  ( $28 \times 10^6$ ) y  $3 \times 10^5$  Pa·s ( $3 \times 10^6$  poise), y después se abate sobre el mandril para comenzar una preforma que proporcionará en última instancia una zona de adquisición de parámetros de sección transversal sustancialmente cuadrada tal como se muestra en las figuras 2, 4, 6, 7A y 7B. Pueden usarse mandriles que tienen otras secciones transversales, por ejemplo, la figura 8B ilustra el abatimiento acabado de un tubo T1' de este tipo sobre un mandril M' para una preforma adecuada para proporcionar una zona de adquisición de parámetros de sección transversal sustancialmente hexagonal tal como se muestra en las figuras 9 y 10; aunque generalmente no es preferible, en algunos casos radios pequeños R" en las esquinas de mandril pueden ser beneficiosos. Tras la retirada a partir del torno, el mandril se retira preferiblemente a partir de tal primer tubo abatido. Después se inserta dicho primer tubo en un tubo de revestimiento de sílice más grande de diámetros interno y externo apropiados, y se monta el par de tubos en un torno en el que se calienta el tubo de revestimiento por encima de su temperatura de transición mientras se hace rotar para lograr una viscosidad preferiblemente en el intervalo de entre  $28 \times 10^5$  ( $28 \times 10^6$ ) y  $3 \times 10^5$  Pa·s ( $3 \times 10^6$  poise), permitiendo así que su superficie interior se fusione a la superficie exterior del primer tubo que comprende el canal axial formado por el mandril. Tal etapa de revestimiento se repite hasta que se forma una preforma de diámetro externo suficiente; para una célula de flujo monolítica que comprende un conducto de volúmetro de Coulter, normalmente se requieren cinco o más revestimientos, con una razón en sección transversal de área de mandril con respecto a área de envuelta preferiblemente entre  $0,4 \times 10^{-4}$  y  $5,1 \times 10^{-4}$  y lo más preferiblemente de aproximadamente  $1,5 \times 10^{-4}$ . Puede preferirse que una parte plana de anchura suficiente para proporcionar una característica de referencia en la preforma estirada (por ejemplo, parte 52 plana en el elemento 31 de la figura 4) se esmerile sobre la superficie exterior de la preforma completada paralela a una superficie de canal. Después se limpia la preforma de manera apropiada, se monta en una torre de estiramiento convencional, se calienta hasta una temperatura predeterminada suficientemente por encima de su temperatura de transición de modo que su viscosidad permite la deformación, y se estira hacia abajo en aire a una orientación angular constante y a una velocidad controlada, preferiblemente entre 0,05 y 2 metros/minuto, mediante lo cual se mantiene la forma en sección transversal poligonal del canal interno durante la operación de estiramiento y se logra el área en sección transversal deseada de tamaño reducido en el canal que se extiende axialmente. Como ejemplo específico, puede compararse la zona Z de adquisición de parámetros en la célula 30 de flujo compuesta de la figura 6 con la de la célula 20' de flujo monolítica análoga en la figura 2. En las figuras 2 y 6 se muestran secciones transversales a través de la zona Z de adquisición de parámetros del paso de muestra en una célula de flujo de cuatro lados; por tanto, estas figuras son igualmente representativas o bien de una célula simplemente de flujo óptico que tiene un paso cuadrado uniforme (por ejemplo, 32' en las figuras 7A y 7B) o bien de una célula de flujo que permite la adquisición de parámetros tanto ópticos como de Coulter dentro de una porción de tal paso que comprende un conducto de volúmetro (por ejemplo, 32 en las figuras 4 y 5). Ejemplos de este último tipo de célula de flujo tienen la porción Z de detección de partículas de tal paso en las figuras 2 y 6 de anchura  $W' \approx 52$  micrómetros y lados 50 de envuelta planos con una anchura de aproximadamente 4,2 mm y longitud de aproximadamente 6,3 mm, que para células de flujo prismáticas útiles en la fabricación de células de flujo monolíticas y compuestas requieren revestimiento y fusión de múltiples tubos de revestimiento sucesivos de diámetro creciente sobre un primer tubo abatido para contener un canal prismático de sección transversal sustancialmente cuadrada. La probabilidad de que se pierda la planitud de pared en la zona Z de adquisición de parámetros en las figuras 2 y 6, y de concentricidad de las superficies de preforma sucesivas con respecto al eje de canal de Z, aumenta con el número de etapas de revestimiento, mientras que la probabilidad de líneas de aire en la preforma estirada aumenta con el área de fusión total por unidad de longitud de preforma (es decir, con la suma de los diámetros de los diversos tubos de revestimiento). Las células 20' de flujo monolíticas de la figura 2 producidas a partir de una célula de flujo prismática a modo de ejemplo que comprende cinco tubos de revestimiento con diámetros de fusión reducidos durante el estiramiento hasta 0,200, 0,436, 0,920, 2,440 y 4,812 mm, tienen una probabilidad que es proporcional a 5 para la pérdida de concentricidad y planitud de superficies de pared de canal, pero proporcional a 8,808 por unidad de longitud para la formación de líneas de aire. El examen de las figuras 2 y 6 hará evidente que para una anchura igual de lados 50 respectivos en la misma, el grosor de pared proporcionado por el elemento 37 de adaptación independiente en la célula 30 de flujo compuesta de la figura 6 reduce el número de tubos de revestimiento requeridos para formar el elemento 31 al que se adapta, en comparación con la célula de flujo prismática requerida para permitir el mecanizado de la envuelta solidaria de la célula 20' de flujo monolítica de la figura 2. Tal como se indica en la tabla 1, resulta viable formar el paso 32, tal como se describe en los comentarios introductorios en el presente documento y se muestra en las figuras 4 y 5, en los elementos 31 que comprenden tres tubos de revestimiento y que tienen un diámetro externo final de 2,44 mm, evitando así dos etapas de revestimiento requeridas por una célula 20' de flujo monolítica comparable. Por tanto, la probabilidad de que se pierda la concentricidad y la planitud en las superficies de pared de canal en tales preformas más pequeñas se vuelve proporcional a 3, una reducción del 40%, y proporcional a 1,556 para la formación de líneas de aire, una reducción del 82%. Tal reducción significativa de la probabilidad de todos los artefactos anteriormente mencionados que surgen en el procedimiento de revestimiento es en sí misma ventajosa, pero tal como también se indica en la tabla 1, menos etapas de revestimiento también facilitan el estiramiento de tales preformas más pequeñas a temperaturas inferiores y viscosidades mayores. Según la patente '187, se calentaron preformas prismáticas para su uso en células de flujo monolíticas hasta temperaturas de estiramiento en el intervalo de entre  $1.610^{\circ}\text{C}$  y  $1.860^{\circ}\text{C}$  para obtener una viscosidad en el intervalo de entre  $60 \times 10^5$  ( $60 \times 10^6$ ) y  $1 \times 10^5$  Pa·s ( $1 \times 10^6$ ) poise, prefiriéndose más un intervalo de temperatura menor y una viscosidad de entre  $3 \times 10^5$  ( $28 \times 10^6$ ) y  $3 \times 10^5$  Pa·s ( $3 \times 10^6$  poise). En cambio, estas últimas condiciones se prefieren menos cuando se estiran preformas destinadas para su uso como



elemento 31 en células de flujo compuestas; se ha encontrado que un estiramiento de este tipo más frío a temperaturas en el intervalo de entre 1.500°C y 1.750°C, con un intervalo de viscosidad de preforma de entre 1.000 x 10<sup>5</sup> (1.000 x 10<sup>6</sup>) y 6 x 10<sup>5</sup> Pa·s (6 x 10<sup>6</sup> poise), es lo más preferible. Una porción del canal prismático final forma la zona Z de adquisición de parámetros crítica de células de flujo fabricadas a partir de segmentos cortados a partir de la preforma estirada, por ejemplo, 30 en las figuras 4-6, 7A y 7B, y tal procedimiento de estiramiento más frío ofrece un control mejorado sobre la planitud en las superficies de canal del mismo. Tal como se indica en la tabla 1, para células de flujo a modo de ejemplo anteriormente mencionadas, el radio recíproco promedio del círculo de mejor ajuste sobre los 28 micrómetros centrales de las cuatro superficies de canal es de 0,30 mm<sup>-1</sup> para células de flujo prismáticas producidas según el método de la patente '187 (por ejemplo, la figura 2), en comparación con 0,19 mm<sup>-1</sup> para las producidas según el método de la presente invención (por ejemplo, la figura 6); una superficie realmente plana tiene un radio recíproco igual a cero. Tanto la reducción del número de etapas de revestimiento como la reducción del 37% de la curvatura de superficie de canal favorecen mejores rendimientos de células de flujo prismáticas proporcionando unas prestaciones ópticas deseadas, requiriendo por tanto menos procedimientos de selección durante el procesamiento tras el estiramiento para dar células de flujo compuestas e integración de éstas en conjuntos de transductor (por ejemplo, tal como T en la figura 3 o T' en la figura 11), con costes reducidos y rendimientos mejorados de las mismas.

También pueden ilustrarse ventajas con respecto a artefactos de mecanizado tras el estiramiento para células de flujo según la presente invención. Tal como se indicó anteriormente, según la patente '187 las células de flujo monolíticas requieren mejorar las células de flujo prismáticas mediante mecanizado de superficies de envuelta no cilíndrica solidarias directamente sobre las mismas, requiriendo tal mejora una alineación apropiada de procedimientos de mecanizado secundario o bien con al menos una superficie de canal dentro de segmentos de una preforma estirada o bien con un segmento plano que se esmeriló sobre la preforma sustancialmente paralelo a una superficie de canal de este tipo antes de las operaciones de calentamiento y estiramiento. Ambas alineaciones son difíciles y requieren una atención excepcional si deben obtenerse como resultado alineaciones hasta menos de aproximadamente dos grados angulares. Surge variabilidad adicional mediante técnicas de montaje normalmente usadas durante la formación secundaria de superficies de envuelta planas sobre células de flujo prismáticas, de modo que los ángulos de cuña de pared (por ejemplo, a entre la superficie 50 de célula de flujo y la superficie de pared de Z de la figura 2) se vuelven más aleatorios, con tendencia a volverse excesivamente variables. Componentes ópticos independientes que comprenden de manera individual o bien superficies de pared de Z que forman una sección transversal de canal deseada o una envuelta acabada que tiene una sección transversal deseada, adaptándose tales componentes mutuamente entre sí y alineándose apropiadamente entre sí en un procedimiento de ensamblaje, evitan las dificultades anteriormente mencionadas en la mejora de células de flujo prismáticas. Tal como demostrará una búsqueda en Internet, hay prismas de muchos diseños y esferas de muchos diámetros, tanto de alta precisión como de excelente calidad de superficie de una variedad de materiales transparentes aislantes incluyendo sílice (SiO<sub>2</sub>), comercialmente disponibles de muchos proveedores de componentes ópticos. El control independiente bajo el cual se mecanizan las superficies ópticas de tales componentes convencionales y se acaban para dar una calidad óptica minimiza la variabilidad en la envuelta eliminando métodos de montaje y mecanizado típicos usados durante la mejora óptica anteriormente mencionada requerida para convertir células de flujo prismáticas en células de flujo monolíticas, al tiempo que se permite una mejora análoga más eficiente mediante una estructura compuesta, es decir, no monolítica, que proporciona ventajas esenciales de células de flujo monolíticas. Adaptar un componente comercial de este tipo apropiado para proporcionar un elemento 37 de adaptación adecuado (por ejemplo, 37 en las figuras 4, 7, 12, 14 y 15; 37' en las figuras 13; o 37'' en la figura 9) requiere el uso de métodos de elaboración de vidrio establecidos para realizar una perforación pasante en (o extraer el núcleo de) y realizar el acabado de tales componentes para adaptarse a un elemento 31 monolítico de la longitud preferida; menos preferiblemente, una porción apropiada de un componente de este tipo puede someterse a esmerilado de contorno y acabado para proporcionar la superficie cóncava de adaptación. Una característica de referencia de prismas mecanizados de este modo (por ejemplo, la superficie 50 óptica en las figuras 4-6, 7A y 7B) o una superficie plana formada en paralelo a la perforación pasante de tales esferas con núcleo extraído como ventana para un haz de interrogación óptico (por ejemplo, 98 en la figura 13C) puede usarse entonces para alinear tales elementos mecanizados o bien a una superficie de canal en tales elementos cilíndricos o bien a una parte plana proporcionada en los mismos antes de estirar la preforma a partir de la cual se separaron tales elementos cilíndricos (por ejemplo, 52 en las figuras 4, 6, 7A y 7B, y 10). La alineación de tales elementos de adaptación con respecto a elementos cilíndricos (por ejemplo, de 37 con respecto a 31 para minimizar el ángulo de cuña a de la figura 6) puede usar métodos ópticos convencionales de alta precisión (por ejemplo, autocolimación) que no se adaptan fácilmente a los métodos de la patente '187. Tales elementos de adaptación y cilíndrico se fijan en la configuración espacial alineada mediante unión con un material de unión óptica apropiado (39 en las figuras anteriormente mencionadas) para proporcionar una célula de flujo de la invención; preferiblemente, tal unión minimiza los efectos de refracción no axisimétricos a través de la unión cilíndrica a través de un material de unión que es sustancialmente no fluorescente. Tanto el control mejorado sobre la geometría de envuelta y las superficies así obtenido, como la facilitación relacionada de una alineación más precisa de superficies de canal y de envuelta, favorecen rendimientos mejorados de células de flujo que proporcionan prestaciones ópticas deseadas con menos procedimientos de selección durante el procesamiento tras el estiramiento y la integración en conjuntos de transductor (por ejemplo, tal como T en la figura 3 o T' en la figura 11).

Aunque tanto los elementos monolíticos cilíndricos como los elementos anulares de adaptación (por ejemplo, 31 y

37 de las figuras 4-6) pueden fabricarse a partir de una variedad de materiales ópticamente transparentes, el índice de refracción desfavorable y otras propiedades de muchos materiales silíceos y la mayoría de los de plástico hacen que lo más preferible sea la sílice amorfa ( $\text{SiO}_2$ ) sintetizada mediante un procedimiento de deposición química en fase de vapor o un procedimiento de sol-gel y que tiene un nivel de impurezas químicas de menos de 2600 ppm.

Entre las propiedades ventajosas tal vidrio de sílice tiene una transmisión excepcional en el intervalo de longitud de onda de 250 a 400 nm, fluorescencia intrínseca muy baja y propiedades dieléctricas excelentes. Hay tubos de sílice adecuados comercialmente disponibles tanto en geometrías convencionales como personalizadas; para los elementos 31 monolíticos cilíndricos comentados en el presente documento, los tubos tienen un diámetro interno (D.I.) en el intervalo de entre 2 y 30 mm, o más preferiblemente entre 6 y 20 mm, y un diámetro externo (D.E.) en el intervalo de entre 6 y 45 mm, o más preferiblemente entre 15 y 35 mm. Esta sílice puede contener dopantes útiles para ajustar las propiedades ópticas de la sílice, por ejemplo, índice de refracción, absorbancia o fluorescencia, así como propiedades físicas tales como punto de ablandamiento, resistencia y distribución de esfuerzos; para su uso en componentes descritos en el presente documento, resulta crucial que cualquier dopante añadido no induzca fluorescencia bajo irradiación por el haz de radiación de interrogación. En comparación con otros vidrios de silicato, el vidrio de sílice fabricado de manera sintética también tiene muy buena resistencia química, bajo coeficiente de dilatación térmica, y muy baja concentración de defectos. Además, las estructuras de sílice estiradas tales como las células de flujo prismáticas descritas en el presente documento tienen resistencia mecánica superior en comparación con estructuras estiradas a partir de preformas fabricadas a partir de otros tipos de vidrio.

Los elementos de células de flujo compuestas pueden ensamblarse y alinearse mediante una variedad de métodos usados en las técnicas electroópticas. Tras cortar de manera convencional segmentos de una longitud preferida a partir de preformas monolíticas cilíndricas estiradas y volverse cuadrados los extremos de las mismas hasta una perpendicularidad aceptable, si es necesario, tales etapas se realizan preferiblemente usando accesorios apropiados. Como ejemplo, tales segmentos (por ejemplo, 31 de las figuras 4-6) pueden montarse en un accesorio para permitir la rotación alrededor del eje del canal de flujo interno y una característica de referencia de los mismos (por ejemplo, la pared cercana de Z o la parte 52 plana) puede alinearse en perpendicular al eje óptico de un autocolimador, fijándose entonces el elemento cilíndrico en la posición orientada. Un elemento anular de adaptación (por ejemplo, 37 de las figuras 4-6) puede montarse con una característica de referencia (por ejemplo, una superficie 50 de envuelta) en contacto con una placa del accesorio, cuya superficie también es perpendicular al eje óptico del autocolimador, moviéndose entonces la placa y el elemento anular para mantener dicha alineación mientras se coloca el elemento anular en la relación espacial deseada con respecto al elemento monolítico cilíndrico orientado (por ejemplo, de modo que el ángulo de cuña  $\alpha$  en la figura 6 se minimiza de manera aceptable). Con dichos elementos alineados de este modo, se aplica un adhesivo óptico de baja fluorescencia, preferiblemente curable por UV, a partir de un dispensador dosificador al espacio libre entre los dos elementos; un vacío regulado puede ser útil para lograr un llenado completo para formar una unión óptica homogénea a través de todo el espacio libre incluyendo aquél entre cualquier parte plana en el elemento cilíndrico y la perforación pasante en el elemento anular (por ejemplo, 39 de las figuras 4-6). El adhesivo transparente aislante (por ejemplo, Loctite 352) se cura lo más preferiblemente antes de retirar los elementos de célula de flujo a partir del accesorio. Más preferiblemente, tras colocar el elemento 37 y el material 39 de unión óptica en la configuración final sobre el elemento 31 pero antes de curar este último, el elemento 37 se posiciona espacialmente y se alinea con respecto al elemento 31 para limitar los efectos de refracción no axisimétricos sobre parámetros ópticos adquiridos en un eje de adquisición predeterminado (por ejemplo, tal como se ilustra mediante el haz de láser B de la figura 4) a partir de cuerpos formados que pasan a través de la zona Z de adquisición de parámetros en el elemento 31 de la célula 30 de flujo. Lo más preferiblemente, tal posicionamiento y alineación se realizan con la célula de flujo montada en un accesorio de pruebas que también repite las porciones relevantes de 18 ó 18' en las figuras 3 u 11, es decir, dotado de un láser 42 de longitud de onda apropiada como fuente de radiación, las ópticas 62 de conformación de haz del láser, y conexiones de fluido de soporte suficientes como para llenar el paso 32 de la figura 4 con diluyente de solución salina fisiológica; el patrón de interferencia de la radiación que pasa a través de la zona de adquisición de parámetros de la célula de flujo rellena puede proyectarse sobre una pantalla, o adquirirse mediante ópticas de acoplamiento apropiadas y sensor de obtención de imágenes que reemplaza a LSD1 y LSD2, y optimizarse mediante rotación relativa entre los dos elementos de célula de flujo para proporcionar un patrón unimodal limpio tal como se conoce en la técnica de pruebas ópticas.

A la vista de la discusión anterior se apreciará que pueden proporcionarse las ventajas citométricas demostradas de células de flujo monolíticas, con desventajas comerciales reducidas que surgen en los procedimientos de fabricación de las mismas, mediante nuevas células de flujo estructuradas y fabricadas según el método de la invención, es decir, células de flujo compuestas que comprenden al menos dos elementos producidos a partir de material transparente aislante, preferiblemente una forma de sílice amorfa sintética ( $\text{SiO}_2$ ). Un elemento de tales células de flujo compuestas es preferiblemente una célula de flujo prismática similar a las que pueden mejorarse ópticamente mediante la adición a las mismas de una envuelta no cilíndrica solidaria para formar una célula de flujo monolítica, pero de construcción más sencilla y de menor diámetro. Con referencia a una célula de flujo a modo de ejemplo, es decir, la célula 30 de flujo en las figuras 3-6, el primer elemento (es decir, 31 en las figuras 4-6) es monolítico, sustancialmente cilíndrico y comprende un canal de flujo interno sin interrupciones (es decir, paso 32 en las figuras 4 y 5) al menos una porción axial del cual (es decir, el conducto Z de volúmetro en las últimas figuras mencionadas) está rodeada por una superficie continua de sección transversal preferiblemente no circular (es decir, Z en la figura 6) para definir una zona de detección de partículas (es decir, zona Z de adquisición de parámetros en las figuras 3-6)

para parámetros caracterizantes citométricos. Otros elementos son anulares ya que comprenden tanto una superficie cóncava adaptada a dicho primer elemento (es decir, preferiblemente mediante una perforación pasante cilíndrica interior o porción de la misma adaptada para recibir dicho primer elemento) como una envuelta óptica no cilíndrica exterior adecuada para la aplicación citométrica y que tiene una relación espacial predeterminada con respecto a dicha superficie cóncava. Para la realización 30 de doble elemento mostrada en las figuras 4-6, el segundo elemento 37 de adaptación anular comprende superficies 50 ópticas sustancialmente planas que forman una envuelta óptica, encierra el primer elemento 31 y está ópticamente unido al mismo mediante material 39 de unión óptica. Es preferible que se minimice el ángulo de cuña a en la figura 6 de modo que las superficies 50 de envuelta se vuelven sustancialmente paralelas a las superficies de pared correspondientes de la zona Z de adquisición de parámetros en las figuras 4 y 6, formando por tanto la pared entre dichas superficies una ventana óptica de grosor sustancialmente uniforme para minimizar los efectos de refracción no axisimétricos sobre parámetros ópticos adquiridos en un eje de adquisición predeterminado (por ejemplo, tal como se ilustra mediante el haz de láser B) a partir de cuerpos formados que pasan a través de la zona Z de adquisición de parámetros en el elemento 31 de la célula 30 de flujo. La minimización de tal ángulo de cuña puede facilitarse mediante la parte 52 plana de referencia formada en la superficie de preforma paralela a una pared del canal prismático en la misma antes de estirar la preforma. Se apreciará que muchas realizaciones de tales células de flujo distintas de la célula 30 de flujo a modo de ejemplo se encuentran dentro del alcance de la presente invención (por ejemplo, tal como se muestra en las figuras 7A, 7B, 9, 12, 13A-13C, 14 y 15). Específicamente, pueden usarse porciones de uno o más segundos elementos anulares en lugar de los segundos elementos anulares solidarios ilustrados en las diversas figuras en el presente documento. De manera similar, componentes de células de flujo estructuradas tal como se describen en el presente documento pueden producirse, de manera menos preferible, a partir de un vidrio distinto de una forma de sílice.

Un método preferido para diferenciar cuerpos formados usando células de flujo de la invención comprende las etapas de: a) proporcionar una célula de flujo del tipo descrito en el presente documento que comprende al menos dos elementos producidos a partir de un material transparente aislante, siendo el primer elemento un elemento monolítico sustancialmente cilíndrico que incluye un paso de flujo interno sin interrupciones al menos una porción axial del cual está rodeada por una superficie continua de sección transversal preferiblemente no circular y teniendo el segundo elemento tanto una superficie cóncava adaptada a tal primer elemento como una envuelta óptica no cilíndrica externa de forma y orientación predeterminadas, estando dicho segundo elemento fijado a dicho primer elemento mediante una unión óptica para minimizar los efectos de refracción no axisimétricos en señales ópticas adquiridas a través de las paredes compuestas (o ventanas) entre superficies correspondientes de dicho paso y dicha envuelta; b) hacer pasar tales suspensiones líquidas a través de una porción de adquisición de parámetros del paso de flujo mientras se irradian cuerpos formados en la misma con un haz de radiación que pasa a través de una de tales paredes; y c) detectar diferentes parámetros ópticos de los cuerpos formados irradiados a través de otra de tales paredes. Preferiblemente, tal célula de flujo tiene al menos tres paredes diferenciadas (o ventanas) a través de las cuales pueden detectarse parámetros de diferenciación ópticos de cuerpos formados en la zona de adquisición de parámetros y, tras irradiar cuerpos formados en la misma con un haz de radiación que pasa a través de una primera pared, puede detectarse la radiación de dispersión directa a partir de los cuerpos formados irradiados a través de una segunda pared y pueden detectarse características de fluorescencia de los cuerpos formados irradiados a través de una tercera pared. Más preferiblemente, tal célula de flujo tiene al menos cinco paredes diferenciadas (o ventanas) a través de las cuales pueden detectarse parámetros de diferenciación ópticos y, tras irradiar cuerpos formados dentro de la zona de adquisición de parámetros con un haz de radiación que pasa a través de una primera pared, puede detectarse la radiación de dispersión directa a partir de los cuerpos formados irradiados a través de una segunda pared, puede detectarse radiación de retrodispersión a partir de los cuerpos formados irradiados a través de una tercera pared; pueden detectarse características de fluorescencia de los cuerpos formados irradiados a través de una cuarta pared; y puede detectarse radiación de dispersión lateral a partir de los cuerpos formados irradiados a través de una quinta pared. Tal como se comentará, aplicaciones citométricas que implican señales ópticas de baja intensidad, es altamente preferible un segundo elemento que tiene una envuelta que comprende una superficie no cilíndrica de revolución, por ejemplo, una superficie esférica. Lo más preferiblemente, al menos algunas de las mediciones ópticas anteriormente mencionadas se combinan con mediciones de volumen V y/o conductividad C de Coulter realizadas simultáneamente en los cuerpos formados irradiados que pasan unos tras otros a través del canal de flujo. Tales parámetros de diferenciación se correlacionan mediante algoritmos convencionales para proporcionar información de diagnóstico deseada.

En primer lugar se describirá un método de uso a modo de ejemplo para células de flujo de la presente invención para la realización de la figura 3. La adquisición simultánea de parámetros de distinción ópticos y de V y/o C de Coulter a partir de un cuerpo formado individual en muestras de sangre completa requiere que la porción Z de adquisición de parámetros del paso de muestra en la célula 30 de flujo de la figura 3 tenga un tamaño comparable a los cuerpos formados que van a caracterizarse, es decir, una constricción (o conducto de volúmetro de Coulter) que tenga secciones transversales y longitudes relativamente pequeñas. Por tanto, si se desean uno o más parámetros de Coulter, la anchura de canal de flujo es normalmente de 150 micrómetros o menos, formando una porción axial de longitud normalmente entre 0,75 y 2,0 veces dicha anchura el conducto de volúmetro. Las células de flujo que comprenden tales conductos de volúmetro tienen normalmente envueltas externas con una anchura de entre 4 y 8 mm y una longitud de entre 4 y 12 mm. Para proporcionar la célula de flujo a modo de ejemplo indicada en la figura 3 y mejor ilustrada en las figuras 4-6, la porción Z de adquisición de parámetros en el paso 32 de la célula 30 de flujo

tiene cuatro lados, es sustancialmente cuadrada, y tiene aproximadamente 50 micrómetros de parte plana a parte plana, proporcionando por tanto un área en sección transversal dentro de la zona Z de adquisición de parámetros de aproximadamente 2.500 micrómetros<sup>2</sup> dentro de una envuelta de la cual la anchura W respectiva de los lados 50 es de entre 4 y 5 mm, o preferiblemente de aproximadamente 4,2 mm, y la longitud L respectiva de cada lado 50 es de entre 6 y 10 mm, o preferiblemente de aproximadamente 6,3 mm. Tal como se muestra en las figuras 4 y 5, el paso 32 se extiende entre las superficies 36 de extremos opuestos de la célula 30 de flujo y es normalmente coaxial con el eje longitudinal A de la misma; contiene flujos de líquido y corrientes de excitación de Coulter dentro de un canal de flujo sin uniones formado perforando parcialmente el canal prismático original en el elemento 31 monolítico cilíndrico a partir de ambos extremos a través de las superficies de extremo del mismo para formar una forma de reloj de arena que tiene perforaciones 54 cilíndricas (por ejemplo, con un diámetro de aproximadamente 1,2 mm) y superficies 55 de revolución (por ejemplo, con un radio de aproximadamente 600 micrómetros) proporcionando una transición suave desde dichas perforaciones hasta una longitud corta de canal prismático original que queda *in situ*, es decir, la porción Z de adquisición de parámetros en las figuras 4 y 5. Lo más preferiblemente, las longitudes para Z en la célula 30 de flujo oscilan entre aproximadamente 1,3 y 1,5 veces la anchura del canal, o entre aproximadamente 65 y 75 micrómetros para la presente realización preferida. Tal paso 32 puede formarse en un elemento 31 cilíndrico de 2,44 mm de diámetro externo y se forma preferiblemente en el mismo antes del ensamblaje y la unión de tal elemento con el elemento 37 de adaptación; sin embargo, el paso 32 también puede formarse tras tal ensamblaje y unión, por ejemplo, en un elemento 31' cilíndrico apropiado de las células 30' de flujo en las figuras 7A y 7B. La porción Z del canal prismático original define por tanto en la proximidad del punto medio axial del paso 32 en las figuras 4 y 5 un conducto de volúmetro de Coulter de sección transversal poligonal uniforme, tal como se muestra en la figura 6, dentro del cual pueden determinarse los parámetros de volumen de CC (V) y conductividad eléctrica de RF (C) de Coulter de cuerpos formados que pasan individuales. Además, la pared formada entre superficies de pared alineadas sustancialmente planas del conducto Z de volúmetro y superficies 50 de envuelta óptica planas de la célula 30 de flujo proporciona ventanas de grosor uniforme que son muy adecuadas para acoplar un haz de láser de interrogación B en el conducto Z de volúmetro para su interacción con cuerpos formados en el mismo y simultáneamente también determinar su absorción de radiación (A), diversas propiedades de dispersión de luz (S) [es decir, dispersión directa (FS), dispersión lateral (SS), y/o retrodispersión (BS)], y propiedades de fluorescencia (F) anteriormente mencionadas. Se entenderá que diferentes longitudes de volúmetro o pasos que comprenden secciones longitudinales de otras geometrías pueden resultar ventajosos en algunas aplicaciones. Algunas aplicaciones citométricas pueden requerir que el haz de radiación de interrogación B pase a través de la zona Z de detección de partículas en paralelo a la superficie 52 de referencia formada en el elemento 31 cilíndrico tal como se muestra en las figuras 4 y 7A, mientras que en otras dicho haz B puede pasar de manera sustancialmente perpendicular a través de tal superficie tal como se muestra en la figura 6.

Tal como se ha indicado, las superficies 36 de extremo de la célula 30 de flujo en las figuras 4 y 5 están unidas de manera sellada a los elementos 34 ó 35 de tapa del conjunto T de transductor de la figura 3 para acoplarse por conexión de fluido a las cámaras internas en el mismo; los elementos 34 y 35 de tapa están dotados de una pluralidad respectiva de orificios P1-P3 y P4-P6 que están acoplados por conexión de fluido a otros componentes de CA. El orificio P1 está acoplado por conexión de fluido al componente 16 dosificador y sirve para proporcionar alícuotas dosificadas de muestra S<sub>L</sub>, S<sub>D</sub> o S<sub>T</sub>, tal como se selecciona mediante la válvula DV de distribución, al tubo 56 de entrada de muestra de la figura 3 para su inyección en el paso 32 de la célula 30 de flujo. En la figura 5, el tubo 56 de entrada de muestra (que sólo se muestra parcialmente) tiene un canal C1 en el que el orificio P1 acopla un volumen de muestra suministrada a presión desde la bomba MP4 dosificadora de la figura 3; el canal C1 sirve para proyectar una corriente 74 de muestra hacia la zona Z de detección de partículas. El orificio P2 también está acoplado por conexión de fluido al componente 16 dosificador y sirve para introducir volúmenes dosificados de un líquido S1 de recubrimiento, a presión mediante la bomba MP4 dosificadora, al interior de la cámara en el elemento 34 de tapa. Tal como se muestra en la figura 5, el líquido S1 de recubrimiento rodea de manera uniforme la corriente 74 de muestra y hace que la muestra fluya a través del centro del conducto Z de volúmetro, enfocando por tanto hidrodinámicamente la corriente 74 de muestra a través del conducto de volúmetro. La corriente 76 de salida y el líquido S2 de recubrimiento desde la bomba MP5 dosificadora se recogen mediante el tubo 58 de salida de muestra de la figura 3 (ilustrado sólo parcialmente en la figura 5), evitando por tanto que cuerpos formados se recirculen al interior del campo eléctrico ambiental del conducto en la cámara en el elemento 35 de tapa e interfieran por tanto con determinaciones de volumen de CC (V) y conductividad eléctrica de RF (C) de Coulter. En la figura 5, se muestra una primera célula BC1 sanguínea tras salir del canal en el tubo 56 de entrada, se muestra una segunda célula BC2 sanguínea en el centro del conducto Z de volúmetro y en la trayectoria del haz de láser enfocado B, y se muestra una tercera célula BC3 sanguínea entrando en el tubo 58 de salida de muestra, que está conectado al residuo a través del orificio P4 en la figura 3. Para controlar la presión de fluido en la cámara en la tapa 35 y de ese modo controlar el flujo de muestra tras salir del paso 32, dicha cámara se mantiene llena de líquido S2 de recubrimiento, entrando tal líquido a través del orificio P5 y drenándose al residuo a través del orificio P4. Tras la adquisición de datos a partir de cada muestra, se prepara el conjunto T de transductor para otra muestra purgando las cámaras en los elementos 34 y 35 de tapa con líquido de recubrimiento, respectivamente, S1 a partir de MP4 al interior del orificio P2 y fuera del orificio P3 y S2 a partir de MP5 al interior del orificio P5 y fuera del orificio P6.

Tal como se muestra en la figura 3, dentro de las cámaras interiores en los elementos 34 y 35 de tapa hay electrodos 40 y 38 internos respectivos que están operativamente conectados a un circuito 41 de CC/RF. Los materiales para los electrodos, y extensiones de electrodo a través de las paredes de dichas cámaras en los

elementos 34 y 35 de tapa para formar conexiones operativas con el circuito 41 de CC/RF, se seleccionan preferiblemente de un grupo de materiales químicamente inertes incluyendo paladio o platino; sin embargo, en algunas aplicaciones pueden servir otros materiales, incluso acero inoxidable bien pasivado (por ejemplo, aleación 316). Los componentes del circuito 41 de CC/RF funcionan para (a) producir corrientes de CC y RF a través del paso 32 de la célula 30 de flujo de la figura 4, y (b) detectar modulaciones en las corrientes de CC y RF respectivas producidas mediante el paso de cuerpos formados a través de la zona Z de detección de partículas simultáneamente con las corrientes de CC y RF, mediante lo cual puede determinarse el volumen de CC V de Coulter de un cuerpo formado, así como su conductividad de RF C. Tal como se describe más completamente en la patente '652, el circuito 41 de CC/RF comprende una fuente de corriente CC, un oscilador/detector de CA que funciona a una frecuencia RF, un circuito de acoplamiento y preamplificadores. El circuito de acoplamiento combina de manera lineal las corrientes producidas por la fuente de CC y el oscilador/detector de CA, y aplica la corriente combinada al contenido del paso 32 en el conjunto T de transductor, tal como se describió anteriormente. Preferiblemente, la componente de CA tiene una frecuencia de aproximadamente 22,5 MHz. A medida que pasan cuerpos formados unos tras otros a través del conducto Z de volúmetro, se altera la impedancia del paso 32, dando como resultado una modulación de la corriente CC en función del volumen físico V del cuerpo (es decir, el volumen de CC) y una modulación de la corriente de RF en función de la conductividad interna C de la célula. El circuito de acoplamiento separa las corrientes moduladas de tal manera que se transmite una señal de pulso de CC V a un preamplificador de CC, y se detecta la corriente de RF modulada mediante el oscilador/detector, dando como resultado una señal de pulso C que se transmite al preamplificador de RF. Preferiblemente, se acoplan señales de pulso tanto de V como de C de Coulter al componente de análisis del analizador citométrico, pero, para algunas aplicaciones, sólo una de tales señales puede ser suficiente. Alternativamente, otras aplicaciones pueden beneficiarse de la inclusión en el circuito 41 de RF/CC de una pluralidad de circuitos de CA tal como se describen en el presente documento, funcionando cada uno a una frecuencia diferente.

A medida que cada cuerpo formado transita por el conducto Z de volúmetro en las figuras 3-6, se irradia al pasar a través de un haz de láser enfocado B de distribución de energía apropiada tal como se proporciona mediante un láser 42 adecuado y ópticas 62 de conformación de haz en el módulo 18 de transductor. Un módulo de transductor adaptable para tal uso se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 8.094.299 y 8.339.585 legalmente cedidas, denominadas a continuación en el presente documento patente '299 o patente '585. El láser 42 puede ser de cualquier tipo apropiado (por ejemplo, un láser de diodo tal como se proporciona en dichas patentes) que proporciona radiación de una longitud de onda adecuada para la aplicación citométrica, por ejemplo, radiación en el intervalo de longitud de onda de 635 a 640 nm si los parámetros de dispersión (S) son de principal interés o en el intervalo de longitud de onda de 485 a 490 nm si también se requieren determinados parámetros de fluorescencia (F). La radiación (luz) dispersada por cada cuerpo formado puede detectarse por uno o más fotodetectores de dispersión de luz (por ejemplo, LSD1-LSD3) y la radiación fluorescente, si la hay, emitida por el marcador fluorescente o la tinción fluorescente del cuerpo formado como resultado de excitarse mediante la radiación de láser, puede detectarse por uno o más detectores de fluorescencia (por ejemplo, FD1-FD3). En la sección longitudinal de la célula 30 de flujo mostrada en la figura 5, dicho haz de láser B se enfoca mediante dicha óptica de conformación de haz para proporcionar una distribución gaussiana bidireccional elíptica de radiación centrada sobre el conducto Z de volúmetro con el eje mayor de la distribución elíptica perpendicular al flujo de muestra y preferiblemente de entre 12 y 15 micrómetros de altura, pero una óptica de conformación de haz estructurada para proporcionar una línea enfocada de menor anchura e intensidad de radiación uniforme a través de dicho conducto es preferible en aplicaciones que requieran coeficientes de variación más pequeños en los parámetros ópticos adquiridos. Se apreciará que múltiples haces de láser conformados de este tipo a partir de uno o más láseres pueden interrogar cuerpos formados individuales dentro del conducto de volúmetro de Coulter típico. En la vista en sección transversal de la célula 30 de flujo mostrada en la figura 6, un haz de este tipo entra en la superficie de pared delantera del conducto Z de volúmetro, se encuentra con la célula BC2 sanguínea en la zona de detección óptica, y hace que radiación de dispersión lateral SS y radiación fluorescente F pase a través de las paredes opuestas del conducto Z de volúmetro en paralelo al eje óptico OA, mientras que luz de dispersión directa FS y luz axialmente absorbida A (no mostradas en la figura 6) pasan a través de la pared trasera de la zona Z de detección de partículas a lo largo del eje óptico OA. Se entenderá que el material de unión usado para formar la unión 39 entre los elementos 31 y 37 de la figura 6 anteriormente mencionados, así como para llenar el espacio entre la parte 52 plana de tal elemento 31 y la superficie de adaptación de tal elemento 37, debe tener calidad óptica, índice de refracción apropiado y fluorescencia mínima cuando se cura.

Tal como se indicó anteriormente y se describe más completamente en las patentes '652 y '585, la radiación (luz) dispersada a partir del haz de láser enfocado B por los cuerpos formados, que pasan unos tras otros a través de tal haz dentro de la zona Z de detección de partículas de la célula 30 de flujo tal como se muestra en las figuras 5 y 6, se detecta mediante fotodetectores de dispersión de luz, por ejemplo, LSD1 y LSD3 en la figura 3. El detector LSD1 está estructurado y ubicado para detectar luz dispersada en un sentido directo dentro de un intervalo angular total de entre aproximadamente 9 grados y 41 grados del eje de dicho haz. Este detector tiene dos regiones fotoactivas diferenciadas, OS1 y OS2, para detectar luz sometida a dispersión directa en los intervalos angulares de entre aproximadamente 21 y 41 grados, denominada dispersión de luz de ángulo medio superior (UMALS), y entre aproximadamente 9 y 20 grados, denominada dispersión de luz de ángulo medio inferior (LMALS). Adicionalmente, las señales de OS1 y OS2 se suman para detectar luz dispersada dentro del intervalo angular de entre aproximadamente 9 y 41 grados, denominada dispersión de luz de ángulo medio (MALS). Por tanto, LSD1

proporciona tres señales de dispersión directa (FS), es decir, MALS, UMALS y LMALS. Además, con relación a la descripción en la patente '652, LSD1 también incluye una abertura central a través de la cual tanto el haz de láser que surge de la célula 30 de flujo como luz dispersada a menos de aproximadamente 8 grados pasan sin obstrucciones como haz B1. El fotodetector LSD2 está ubicado de manera apropiada por detrás de LSD1 y tiene dos regiones fotoactivas diferenciadas, OS3 y OS4, que están estructuradas para detectar luz dispersada a aproximadamente 5,1 grados, denominada dispersión de luz de ángulo bajo (LALS), y la atenuación casi axial en B1, denominada pérdida de luz axial (ALL). Por tanto, el detector LSD2 proporciona dos señales adicionales para el análisis, es decir, una cuarta señal de FS, denominada LALS, y la señal de absorción (A), denominada ALL. El detector LSD3 está ubicado para detectar luz dispersada en una dirección sustancialmente normal (es decir, a aproximadamente 90 grados + aproximadamente 10 grados) con respecto al eje de haz B, a través de una de las dos caras laterales de la célula 30 de flujo. El detector LSD3 comprende preferiblemente una lente 85 que recoge y dirige luz sometida a dispersión lateral sobre un diodo OS5 de PIN o similar y proporciona una señal de dispersión lateral (SS). Se entiende que cualquiera de los sensores anteriormente mencionados puede estructurarse para responder a radiación dentro de otros intervalos angulares. También se entiende que, si se desea, un cuarto fotodetector, estructurado de manera similar a LSD1 y ubicado de manera adecuada entre la óptica 62 de conformación de haz y la célula 30 de flujo, proporcionará señales de retrodispersión (BS) a partir de cuerpos formados en la zona Z de detección de partículas. En la figura 3 se muestra el acoplamiento de espacio libre entre el láser 42 y la óptica 62 de conformación de haz, entre la óptica 62 de conformación de haz y la célula 30 de flujo, y entre la célula 30 de flujo y los diversos fotodetectores, pero se entiende que en algunas realizaciones un acoplamiento por fibra óptica puede sustituir ventajosamente a tal acoplamiento de espacio libre entre cualquiera de tales elementos funcionales en el módulo 18 de transductor.

Se obtiene radiación fluorescente como resultado cuando luz a una longitud de onda de irradiación apropiada estimula la emisión de luz a partir de restos fluorescentes a una o más longitudes de onda diferentes; tal como se indicó anteriormente, tales restos pueden unirse a, o insertarse en, diversos cuerpos formados tal como se conoce en protocolos de preparación de muestras para su uso con citómetros de flujo de fluorescencia convencionales. Tal como se describe más completamente en la patente '652, la radiación fluorescente a partir de tales cuerpos formados que pasan a través del haz de radiación B anteriormente mencionado en la zona Z de detección de partículas de la célula 30 de flujo se recoge mediante la lente 51 plano-convexa. La lente 51 está preferiblemente acoplada (por ejemplo, mediante un cemento óptico o un gel de índice de refracción apropiado y que tiene fluorescencia mínima) a la cara lateral de la célula 30 de flujo opuesta a la cara a través de la cual se detecta la luz sometida a dispersión lateral mediante LSD3, funcionando tal lente para acoplar ópticamente radiación fluorescente fuera de la zona Z de detección de células a un segundo conjunto 70 de lente que la retransmite, a través de una red de espejos BS1 y BS2 dicróicos de división de haz y filtros 71, 72 y 73 de paso de banda, a una pluralidad de detectores FD1, FD2 y FD3 de fluorescencia, que pueden ser tubos de fotomultiplicador o similares. Si el haz de radiación B se origina a partir de un láser 42 que funciona, por ejemplo, a 488 nm, dicha red puede estar diseñada de manera convencional, por ejemplo, para acoplar, de la manera más eficiente, luz a 525 nm, 575 nm y 695 nm a detectores FD1-FD3 de fluorescencia. De una manera convencional, cada detector de fluorescencia detecta radiación fluorescente en tal intervalo de longitud de onda predeterminado según las propiedades ópticas de los espejos dicróicos y filtros que lo preceden y convierte dicha radiación en señales eléctricas correspondientes. Se entiende que la red de espejos dicróicos de división de haz y filtros de paso de banda puede extenderse, para permitir detectores de fluorescencia adicionales para proporcionar señales a longitudes de onda adicionales a partir de cuerpos formados en la zona Z de detección de partículas, o que en algunas realizaciones un acoplamiento por fibra óptica puede sustituir ventajosamente al acoplamiento de espacio libre entre cualquiera de los elementos ópticos en el módulo 18 de transductor.

La figura 9 ilustra otra célula 30" de flujo adaptada para su uso en otras realizaciones de la instrumentación de la figura 3. En cuanto a la célula 30 de flujo de la figura 3, la célula 30" de flujo de la figura 9 comprende un elemento 31" monolítico cilíndrico, lo más preferiblemente producido a partir de sílice amorfa sintética (SiO<sub>2</sub>), y un segundo elemento 37" óptico que se adapta y se fija a la misma mediante una unión 39 óptica según el método de la presente invención. Una zona Z" de detección de partículas central, de una sección transversal limitada por seis superficies 64 planas a aproximadamente 55 micrómetros desde su superficie opuesta, se extiende aproximadamente 70 micrómetros a lo largo del eje longitudinal A de la célula 30" de flujo para formar un conducto de volúmetro entre las superficies 55 de revolución y las perforaciones 54 dentro del paso 32" formado entre las superficies 36" de extremo planas tal como se describe para la célula 30 de flujo de la figura 3. Las superficies 36" de extremo planas opuestas están acopladas de manera similar en el conjunto de transductor de soporte y circuito de fluido tal como se describe para las superficies 36 de extremo de la célula 30 de flujo de la figura 3, y se adquieren parámetros caracterizantes V y/o C de Coulter a partir de cuerpos formados que pasan a través del conducto de volúmetro en el paso 32" tal como también se ha descrito. Sin embargo, su estructura hace que la célula 30" de flujo sea más versátil que la célula 30 de flujo de la figura 3. La envuelta de la célula 30" de flujo de la figura 9 también es de forma prismática, estando limitada por seis lados 60 laterales de forma rectangular, y el par anteriormente mencionado de superficies 36" de extremo planas opuestas de forma hexagonal. Preferiblemente, las secciones transversales hexagonales respectivas de la zona Z" de detección de partículas y la envuelta de la célula 30" de flujo son sustancialmente similares y coaxiales, definiendo las seis superficies 60 planas el límite lateral de dicha envuelta que se disponen durante la unión óptica de dichos elementos 31" y 37" para ser sustancialmente paralelas a las seis superficies 64 planas respectivas de la zona Z" de detección de partículas tal como se muestra en la figura 10. Al

alinearse dichas secciones transversales de este modo, por ejemplo, mediante el uso de la parte 52 plana en el elemento 31" cilíndrico, se proporcionan seis paredes de grosor uniforme predeterminado y que forman ventanas planas para introducir un haz de radiación en la zona Z" de detección de partículas y para acoplar tal radiación fuera de dicha zona de detección de partículas tras la interacción con cuerpos formados que pasan unos tras otros a través de la misma, de este modo pueden adquirirse simultáneamente parámetros caracterizantes ópticos con los parámetros V y/o C de Coulter anteriormente mencionados. En la figura 10 se muestra una sección transversal a través de la porción de detección de partículas del paso de muestra en una célula 30" de flujo de seis lados; por tanto, la figura 10 es igualmente representativa de una célula simplemente de flujo óptico que tiene un canal de flujo hexagonal uniforme o una que permite la adquisición de parámetros tanto ópticos como de Coulter dentro de una porción de tal canal que forma un conducto de volúmetro tal como se muestra en la figura 9.

En la parte de introducción del presente documento se indicó la complejidad en el módulo 18 de transductor de la figura 3 requerido para adquirir de manera convencional varios parámetros caracterizantes ópticos a través de una única ventana de célula de flujo, por ejemplo, la red anteriormente mencionada de espejos BS1 y BS2 dicróicos de división de haz y filtros 71, 72 y 73 de paso de banda para adquirir múltiples parámetros fluorescentes en el módulo 18 de transductor de la figura 3. Tal complejidad puede reducirse mediante un método de uso para la célula 30" de flujo de las figuras 9 y 10. En la figura 10 el haz de láser B pasa a través de la ventana W1 para irradiar un cuerpo BC2 formado que transita por la zona Z" de detección de partículas en una dirección perpendicular al plano del dibujo. La absorbancia (A) del haz B mediante el cuerpo BC2 formado irradiado se determina a partir de la intensidad del haz B' parcialmente absorbido que pasa a través de la ventana W2, por ejemplo, mediante la porción de OS4 del fotodetector LSD2 de la figura 3. La luz directa dispersada por el cuerpo formado irradiado se mide a dos ángulos diferentes (LS1 y LS2) a través de las ventanas W2 y W4, por ejemplo, LS1 a través de la ventana W2 mediante una o más regiones OS1, OS2 y OS3 fotoactivas de los fotodetectores LSD1 y LSD2 de la figura 3; y LS2 a través de la ventana W4 mediante la región OS5 fotoactiva ubicada de manera adecuada del fotodetector LSD3 de la figura 3. La radiación de fluorescencia emitida a diferentes longitudes de onda puede medirse a través de una o más de las ventanas W3, W5 y W6 restantes mediante repeticiones completas o parciales de la red de recogida y separación de longitud de onda para fluorescencia descrita en relación con la realización de la figura 3. Sin embargo, en muchas aplicaciones que requieren mediciones de fluorescencia no se necesita tal elaboración y, mediante los lados adicionales en la zona de detección interna y la envuelta de células de flujo tal como se muestra en las figuras 9 y 10, pueden medirse múltiples parámetros de fluorescencia de manera independiente a través de una ventana dedicada, evitando por tanto las complicaciones prácticas debidas a los divisores BS1 y BS2 de haz en serie en la trayectoria de detección de fluorescencia mostrada en la figura 3. En tales realizaciones, F1 y F2 se miden a través de las ventanas W3 y W5 respectivamente, por ejemplo mediante repeticiones ubicadas de manera adecuada de la lente 51, el conjunto 70 de lente, el filtro 73 y el detector FD3 de fluorescencia de la figura 3, pero sin BS1 y BS2 en la trayectoria óptica. Se muestra que la luz a bajos ángulos de retrodispersión sale de la ventana W6 pero, si es preferible, puede medirse radiación de fluorescencia a una tercera longitud de onda a través de esta ventana mediante una repetición de la lente 51, el conjunto 70 de lente, el filtro 73 y el detector FD3 de fluorescencia de la figura 3.

Un módulo 18' de transductor de este tipo, que, por claridad de ilustración, se basa únicamente en parámetros ópticos, se ilustra en la figura 11, en la que etiquetas repetidas de la figura 3 tienen significados y funciones idénticos tal como se indica en la discusión relacionada con la misma y en la que se entiende que la célula 30" de flujo es una célula simplemente de flujo óptico que tiene un paso de muestra apropiado de sección transversal hexagonal uniforme, por ejemplo, análogo al paso 32' cuadrado en las células 30' de flujo en las figuras 7A y 7B. En tales aplicaciones, la ausencia de un conducto de volúmetro de Coulter hace que el purgado de muestra adecuado tras el análisis del conjunto T' de transductor sea más fácil de lograr tal como se ha comentado, de modo que además de los electrodos 38 y 40 de Coulter y el circuito 41 de RF/CC de la figura 3, un segundo recubrimiento S2, su bomba MP5 dosificadora, y los orificios P3, P5 y P6 asociados en los elementos 34 y 35 de tapa del conjunto T de transductor no aparecen en la figura 11. El haz de láser de excitación B a partir del láser 42 y la óptica 62 de conformación de haz, o su equivalente de conformación de haz acoplado por fibra, entra por una ventana de la célula 30" de flujo de la figura 11 y sale por una segunda ventana opuesta a la primera, tras dispersarse por cuerpos formados en el canal Z" de flujo prismático. Se adquieren señales sensibles a la radiación dispersada por, o resultante de la interacción del haz de láser B con, cuerpos formados individuales en una dirección sustancialmente perpendicular a las otras ventanas mediante sensores apropiados. La luz sometida a dispersión directa se intercepta por los fotodetectores LSD1 y LSD2 tal como se describe para la realización de la figura 3, produciendo por tanto señales sometidas a dispersión directa (FS) análogas. La radiación de fluorescencia emitida por restos fluorescentes sobre o dentro de los cuerpos formados (F1 y F2 en la figura 10) se intercepta por al menos uno de los módulos 75 y 77 de recogida de fibra óptica ubicados de manera adecuada a través de una tercera ventana (W3 o W5 en la figura 10) y acoplados a detectores FD5-FD14 de fluorescencia en la figura 11 mediante fibra 80 óptica; ejemplos de tales disposiciones de recogida y acoplamiento de fibra aparecen en las patentes estadounidenses n.ºs 6.869.569 y 6.922.241 legalmente cedidas. Alternativamente, tal interceptación y conversión de fluorescencia en señales eléctricas puede lograrse con acoplamiento óptico de espacio libre tal como se ilustra en la figura 3, ubicado de manera apropiada para recoger de manera eficiente fluorescencia emitida. La luz sometida a dispersión lateral de ángulo bajo (LS2 a través de una cuarta ventana W4 en la figura 10) puede interceptarse mediante una lente 85 de recogida y fotodetector LSD3 de la figura 11 ubicados de manera adecuada para la conversión mediante la región OS5 fotoactiva de este último para dar una señal de dispersión lateral (SS). De manera similar, la luz sometida a

retrodispersión de ángulo bajo (LS3 a través de una quinta ventana W6 en la figura 10) puede interceptarse mediante una combinación ubicada de manera adecuada de una lente de recogida (no mostrada, para minimizar la confusión) y el fotodetector LSD4 de la figura 11 para la conversión mediante la región OS6 fotoactiva de este último para dar una señal de dispersión lateral (SS); si es preferible, en vez de eso puede medirse radiación de fluorescencia a una tercera longitud de onda a través de esta ventana mediante una tercera disposición de recogida de fluorescencia y transducción ubicada de manera adecuada tal como se describió anteriormente. Se entiende que la luz directamente sometida a retrodispersión puede medirse a través de la ventana W1 de la figura 10 de la misma manera tal como se describió anteriormente para la realización en la figura 3. Si se desean parámetros V y/o C de Coulter, la célula 30" de flujo de la figura 11 debe comprender el paso 32" que comprende un conducto de volúmetro entre superficies 55 de revolución apropiadas y perforaciones 54 tal como se muestra en la figura 9; además, el conjunto T' de transductor requerirá los electrodos 38 y 40 de la figura 3 conectados de manera operativa al circuito 41 de CC/RF, la bomba MP5 dosificadora y el recubrimiento S2, y algunos o todos de los orificios P3, P5 y P6; la totalidad de dichos componentes funcionan tal como se describe para la realización a modo de ejemplo ilustrada en la figura 3. Se entiende que realizaciones según la figura 9, pero adecuadas para aplicaciones citométricas particulares, pueden beneficiarse de tener o bien más o bien menos que las seis ventanas ilustradas en la misma, es decir, células de flujo óptico compuestas que tienen secciones transversales poligonales similares a través de la porción de detección de partículas de sus pasos de muestra y sus envueltas alineadas tal como se describe pero que tienen, por ejemplo tres, cinco, siete u ocho ventanas.

Los módulos 18 y 18' de transductor respectivos de las figuras 3 y 11 desarrollan parámetros caracterizantes de dispersión y fluorescencia resultantes de la interacción de un haz de radiación de interrogación B con cuerpos formados individuales que transitan unos tras otros a través de la porción Z de adquisición de parámetros del paso de flujo en la célula 30 ó 30" de flujo. Tal como se conoce en la técnica citométrica, los cuerpos formados también pueden diferenciarse en subpoblaciones mediante características de distinción capturadas en imágenes obtenidas durante su paso a través de un haz de este tipo; conjuntos T o T' de transductor que comprenden células de flujo producidas y estructuradas según la presente invención pueden usarse con ópticas de acoplamiento y un sensor de imágenes apropiado en lugar de otras disposiciones de sensores, por ejemplo, de LSD1 y LSD2 en los módulos 18 ó 18' de transductor. Los parámetros de diferenciación derivados a partir de imágenes de cuerpos formados adquiridas de este modo pueden facilitar considerablemente determinaciones citológicas y de diagnóstico de amplio interés clínico cuando se procesan solas mediante algoritmos de correlación convencionales o, más preferiblemente, se procesan de este modo en combinación con otros parámetros caracterizantes comentados en los ejemplos anteriores.

Realizaciones de instrumentos análogas o bien a la figura 3 o bien a la figura 11 pueden comprender células de flujo estructuradas de manera diferente con respecto a las células 30 ó 30" de flujo mostradas en las mismas. Por ejemplo, las figuras 7A y 7B son ilustraciones en perspectiva de células 30' de flujo de cuatro lados que pueden producirse mediante el método de la invención. Las células 30' de flujo tienen pasos 32' uniformes rectilíneos en el elemento 31' y, tal como se indicó anteriormente, son útiles en realizaciones de la instrumentación de la figura 3 que se basan únicamente en propiedades ópticas para diferenciar cuerpos formados en subpoblaciones. En tales realizaciones se adquieren parámetros de distinción de la manera anteriormente mencionada a partir de cuerpos formados que pasan unos tras otros a través del haz de láser B de la figura 3 dentro de la zona Z de detección de partículas mientras transitan por un canal 32' de flujo cuadrado de dimensiones apropiadas en la célula 30' de flujo tal como se muestra en la figura 6. El elemento 31' puede tener un diámetro de aproximadamente 1,5 mm o mayor; se han fabricado células de flujo prismáticas adecuadas para su uso como tales elementos, de diversas longitudes y que tienen canales 32' de flujo de 47, 52, 65, 75, 100, 140 ó 250 micrómetros entre sus superficies de canal planas. La alineación de características de referencia de los elementos 31' y 37 (por ejemplo, la parte 52 plana en el elemento 31' con las superficies 50 ópticas del elemento 37) durante el ensamblaje de la célula 30' de flujo, o el ensamblaje de una célula 30' de flujo completada en un conjunto de transductor, puede facilitarse si el elemento 31' tiene una longitud mayor que el elemento 37 tal como se muestra en la figura 7B. El paso 32' del elemento 31' puede proporcionarse como un paso en forma de arena tal como se describió anteriormente para el paso 32 de la célula 30 de flujo en las figuras 4 y 5 antes de tal ensamblaje, operación en la que la parte 52 plana proporciona una superficie de referencia para la fijación durante el mecanizado necesario del paso 32'. Si se desea, pueden retirarse extensiones del elemento 31' más allá del elemento 37 tras la alineación y la fijación de este último elemento al elemento 31'. Alternativamente, las células 30' de flujo de las figuras 7A y 7B, que comprenden un paso 32' de dimensiones deseadas en el elemento 31' de diámetro apropiado (por ejemplo, aproximadamente 2 mm o mayor) y el elemento 37 alineado y fijado al mismo que comprende superficies 50 ópticas de anchura y longitud deseadas, pueden procesarse adicionalmente para dar células 30 de flujo para su uso en la instrumentación de la figura 3 formando un conducto de volúmetro de Coulter en el paso 32' tal como se describió. Las células de flujo producidas de esta manera para comprender un conducto Z de volúmetro de 52 micrómetros de anchura y 70 micrómetros de longitud en una envuelta que tiene superficies 50 ópticas de anchura y longitud apropiadas son adecuadas para su uso en determinados analizadores de hematología producidos y comercializados por Beckman Coulter, Inc. Las estructuras de célula de flujo de las figuras 7A y 7B pueden adaptarse de una manera evidente para proporcionar células 30" de flujo análogas de las figuras 9 u 11 mediante el método de la invención, es decir, mediante el uso de los elementos 31" y 37" apropiados.

Normalmente se usan flujos descendentes a través de conjuntos de transductor en citómetros de flujo que clasifican



cuerpos formados seleccionados en una muestra en receptáculos individuales según sus características de distinción. La figura 12 ilustra una sección longitudinal que incluye el eje de flujo de otra realización de célula de flujo útil en un citómetro de flujo que se basa únicamente en propiedades ópticas de cuerpos formados (por ejemplo, BC1-BC3) que pasan unos tras otros a través del haz de láser B para diferenciar y clasificar subpoblaciones seleccionadas según sus parámetros caracterizantes, por ejemplo determinados clasificadores celulares producidos y comercializados por Beckman Coulter, Inc. La célula 30 de flujo de la figura 12 es de tamaño y estructura similares a la célula 30 de flujo a modo de ejemplo de las figuras 4-6 y también puede fabricarse a partir de la célula 30' de flujo en la figura 7A, formándose la abertura JA de chorro en la misma mediante los métodos usados para formar el conducto Z de volúmetro de la célula 30 de flujo en la figura 4. La célula 30 de flujo de la figura 12 se une de manera sellada y se acopla por conexión de fluido únicamente mediante su superficie 36 de extremo superior al elemento 34 de tapa de la figura 11, no necesitándose el elemento 35 de tapa y su orificio P4; excepto por los flujos descendentes indicados en la misma, los elementos en la figura 12 marcados de manera idéntica a los de la figura 5 funcionan de una manera similar, es decir, la corriente 74 de muestra se proyecta hacia JA mediante el canal C1 en el tubo 56 de entrada y se rodea por el líquido S1 de recubrimiento en el paso 33 tal como se describió. El paso 33 difiere del paso 32 de la figura 5 porque tiene una perforación 54 más larga a través de la superficie 36 de extremo superior, de modo que la porción de canal cuadrado original que forma la abertura JA de chorro está ubicada cerca de la superficie 36 de extremo inferior que, tal como se indica, no está unida a conexiones de fluido de instrumento. La abertura JA de chorro es una porción del paso prismático original, con una sección transversal de 75 por 75 micrómetros, aproximadamente 500 micrómetros de longitud entre las superficies 55 y 57 de revolución y dentro de una envuelta cuadrada que comprende las superficies 50 planas de aproximadamente 4 mm de anchura por 6 mm de longitud. La corriente 76' compuesta de las corrientes de recubrimiento exterior y muestra central sale a través de la abertura JA de chorro para formar un chorro en el aire. Aunque se muestra que el haz de láser B interroga el cuerpo BC2 formado en la corriente de muestra por encima de la abertura JA de chorro, en algunas aplicaciones puede resultar ventajoso acoplar el haz de láser B tal como se describe para la instrumentación de la figura 3, es decir, a través de la pared de célula de flujo que rodea la abertura JA de chorro, de modo que la detección óptica se produce dentro de la propia abertura de chorro. Alternativamente, pueden enfocarse uno o más haces de láser B a lo largo del chorro que surge de la abertura JA, permitiendo así la adquisición secuencial de parámetros caracterizantes a partir de cuerpos formados (por ejemplo, BC3) en la corriente 76' como en determinados citómetros de flujo de clasificación producidos y comercializados por Beckman Coulter, Inc. Independientemente del método de interrogación óptica específico, después pueden desviarse de manera electrostática gotas que contienen cuerpos formados deseados de la manera convencional según los parámetros caracterizantes detectados mediante métodos de transducción óptica convencionales.

Las figuras 13A-13C, 14 y 15 ilustran otras células de flujo a modo de ejemplo que ilustran otras propiedades de células de flujo dentro del alcance de la invención. En las figuras 13C, 14 y 15 aparecen vistas en sección transversal a través de la zona Z de detección de partículas de diversas células de flujo; tales vistas son igualmente representativas de células de flujo que tienen un paso uniforme para la adquisición de parámetros caracterizantes simplemente ópticos (por ejemplo, en las figuras 7A, 7B y 13A); un paso en forma de reloj de arena que comprende un conducto de volúmetro de Coulter (por ejemplo, en las figuras 4, 5, 9 y 13B); o un paso similar que comprende una abertura de chorro para la clasificación de cuerpos formados (por ejemplo, en la figura 12). Tales células de flujo son adecuadas para instrumentación análoga a la ilustrada en las figuras 3 u 11, para la que, a la vista de la discusión anterior, pueden adaptarse de manera directa por los expertos en la técnica de citometría de flujo.

Todas las células de flujo descritas en el presente documento tienen zonas de adquisición de parámetros prismáticas dentro de una envuelta que tiene superficies externas paralelas a las mismas para formar ventanas de grosor sustancialmente uniforme a través de las cuales pueden adquirirse parámetros citométricos de cuerpos formados que transitan por la porción de detección de partículas dentro del paso de célula de flujo. Tal como se comentó en la parte de introducción del presente documento, tales ventanas evitan la refracción no axisimétrica, pero los rayos que se originan cerca del eje de célula de flujo se refractarán alejándose de la superficie normal en su incidencia sobre la superficie de envuelta ( $\text{sen}\theta_2 \approx 1,457 \text{ sen}\theta_1$ ), produciendo por tanto un aumento de refracción en la abertura angular efectiva en la superficie de contacto sílice/aire para luz que sale de la célula de flujo. Las figuras 13A-13C ilustran diferentes aspectos de las células 90 de flujo fabricadas proporcionando una célula 31' de flujo prismática con una envuelta producida extrayendo el núcleo y fijando a la misma un sólido 37' esférico en vez de sólidos prismáticos con el núcleo extraído como en los ejemplos anteriores de células de flujo producidas mediante el método de la invención; el elemento 37' está preferiblemente fijado al elemento 31' en la unión 39 óptica para ser coaxial con el paso 32' prismático en la figura 13A o 32 en la figura 13B. Preferiblemente, la parte 98 plana para acoplar la radiación de interrogación en la porción Z de detección de tal paso se realiza como parte plana de referencia paralela a la perforación pasante en el elemento 37'. La figura 13A es una vista en perspectiva de una célula 90 de flujo de este tipo adecuada para su uso en instrumentación que se basa únicamente en parámetros ópticos para distinguir tipos de cuerpos formados (por ejemplo, la de la figura 11). La figura 13B ilustra una sección longitudinal axial de una célula de flujo óptico similar que comprende un conducto de volúmetro central para la determinación simultánea de propiedades tanto ópticas como de V y/o C de Coulter como en la figura 3; producido al igual que el conducto Z de volúmetro en la figura 4, el paso 32 comprende perforaciones 54 desde superficies 91 de extremo y superficies 55 de transición de revolución desde perforaciones hasta el conducto Z de volúmetro. La figura 13C es una sección transversal a través de la zona de detección de partículas de la célula de flujo en la figura 13A o 13B. El haz de láser B entra en la célula 90 de flujo a través de la parte 98 plana e interacciona con cuerpos

formados (por ejemplo, BC2) dentro de la zona Z de detección de partículas. La luz dispersada a partir del haz de láser B mediante cuerpos formados (por ejemplo, FS a lo largo del eje óptico OA o SS perpendicular al mismo), o emitida a partir de restos de fluorescencia usados para marcar alguna población de cuerpos formados (por ejemplo, F), se desviará ligeramente (es decir,  $\text{sen}\theta_2 \approx 0,915 \text{ sen}\theta_1$ ) de una manera axisimétrica al cruzar la superficie plana del canal 32' de flujo en la figura 13A o el conducto Z de volúmetro de la figura 13B, mientras que tanto la cantidad como la no axisimetría de la desviación por refracción en la unión 39 cilíndrica dependen de la aproximación a la homogeneidad óptica a través del mismo. Sin embargo, en la envuelta esférica formada por la superficie 97 de revolución en la figura 13C,  $\text{sen}\theta_2 = \text{sen}\theta_1 = 0$ , y tal luz no se desviará por refracción al pasar a través de la superficie de contacto vidrio/aire, mientras que la luz que pasa de manera similar a través de una envuelta que comprende superficies planas se desvía por refracción según la desigualdad relativamente grande en el índice de refracción ( $\approx 1,475/1,000$ ) entre la sílice y el aire tal como se muestra en las figuras 6, 14 y 15. Por consiguiente, las células de flujo tales como 90 en las figuras 13A y 13B ofrecen una mayor eficiencia de recogida para una abertura de aceptación dada del aparato de detección y por tanto son especialmente ventajosas cuando deben detectarse niveles de luz bajos.

Todas las células de flujo descritas en el presente documento tienen sección transversal implícitamente regular, y ninguna aplica fuerzas de rotación significativas a cuerpos formados asimétricos en flujos de muestra. La figura 14 es ilustrativa de células 30 de flujo que comprenden canales de flujo prismáticos no regulares que pueden actuar para orientar de manera preferente tales cuerpos formados a través del haz de interrogación dentro de la zona de adquisición de parámetros. Tales células de flujo son útiles en la instrumentación que se basa únicamente en propiedades ópticas de cuerpos formados para diferenciar subpoblaciones. En tales células de flujo se adquieren parámetros ópticos a partir de cuerpos formados (por ejemplo BC2) que transitan por un canal Z de flujo rectangular en el elemento 31, ubicado descentrado dentro del elemento 37 conjunto pero que tiene preferiblemente todas las superficies 50 ópticas de este último alineadas en paralelo a superficies correspondientes de Z antes de la formación de la unión 39 óptica. La ventana delgada de la célula 30 de flujo, es decir, a través de la cual sale F1, permite la recogida de radiación de fluorescencia excitada por el haz de láser B con ópticas de recogida más pequeñas y menos costosas (por ejemplo, la lente 51 en la figura 3) que las necesarias con grosores de pared de célula de flujo típicos. Pueden adquirirse señales de dispersión directa (FS) a lo largo del eje óptico OA u otros parámetros ópticos, por ejemplo, una segunda señal de fluorescencia (F2) o una señal de dispersión lateral (SS), de la manera convencional a través de paredes de grosor típico. Se han fabricado células de flujo monolíticas según la patente '187 a partir de células de flujo prismáticas que tienen canales de 320 por 140 micrómetros, es decir, con una relación de aspecto de aproximadamente 2,3, y un diámetro que permite una envuelta mecanizada que comprende lados con una anchura de 5,0 mm antes de la formación de dicha ventana delgada; aunque tales células de flujo monolíticas evitan las desventajas de células de flujo compuestas, la relación de aspecto necesaria en el canal rectangular conduce a una curvatura impredecible en las superficies de canal más largas de las células de flujo prismáticas estiradas y, por tanto, a efectos de refracción no axisimétricos impredecibles tanto en el haz de interrogación como en los parámetros ópticos resultantes. Tal como se indicó en porciones anteriores de la presente descripción, las menos etapas de revestimiento requeridas para formar el elemento 31 monolítico cilíndrico de la figura 14 no sólo reducen la probabilidad de que se pierda la planitud de pared durante la fabricación de preforma, sino que también facilitan un mejor control sobre la planitud de pared durante el procedimiento de estiramiento más frío permitido por los diámetros de preforma más pequeños requeridos. Se ha encontrado que superficies de pared de paso opuestas de anchura principal de aproximadamente 300 micrómetros, continuas con respecto a superficies de pared opuestas sustancialmente planas de aproximadamente 130 micrómetros de anchura, pueden producirse con planitud mejorada en células de flujo prismáticas de un diámetro menor (por ejemplo, aproximadamente 1,5 mm) adecuadas como elemento 31 en la célula 30 de flujo de la figura 14. Las dos superficies de pared opuestas principales de la zona Z de adquisición de parámetros también facilitan la alineación de las mismas con superficies 50 ópticas de envuelta correspondientes, minimizando así la necesidad de la parte 52 plana tal como se muestra para las células de flujo en las figuras 4, 6, 7 y 10. Se entenderá que el haz de radiación B puede acoplarse a través de la célula 30 de flujo en una dirección perpendicular a la mostrada en la figura 14; alternativamente, el elemento 31 puede hacerse rotar 90° en el elemento 37 en el mismo. La célula 30 de flujo de la figura 14 puede procesarse adicionalmente para dar la célula 30 de flujo para su uso en la instrumentación de la figura 3 modificando el paso en el elemento 31 para formar un conducto de volúmetro de Coulter tal como se describió; sin embargo, esto reduce significativamente el efecto de orientación sobre cuerpos formados asimétricos. También se entenderá que otras realizaciones de célula de flujo según la invención pueden estructurarse de manera análoga, por ejemplo, para proporcionar la funcionalidad de células de flujo que tienen un conducto de volúmetro triangular y una placa transparente delgada para una ventana óptica tal como se describe en la solicitud de patente estadounidense 2007/0085997. Tales células de flujo pueden formarse alineando y fijando el prisma de cuatro lados irregular apropiado a un elemento cilíndrico que comprende un paso triangular de dimensiones deseadas (por ejemplo, que tiene superficies de canal de aproximadamente 125 micrómetros de anchura), después revistiendo el más largo de los lados de prisma desiguales hasta el grosor de ventana deseado; la ventana resultante comprenderá un área central de elemento cilíndrico más o menos expuesto dependiente de áreas opuestas en el prisma, estando la unión óptica entre los dos elementos expuesta al entorno, pero no al contenido de paso.

Tal como se indicó en la parte de introducción del presente documento, es preferible que se minimicen los efectos de refracción no axisimétricos en la superficie de envuelta de células de flujo óptico y lo más preferible que se minimicen tales efectos en superficies tanto de la envuelta externa como de la porción de detección del paso interno.

Las células 30 de flujo de las figuras 4 y 14, 30' de las figuras 7A y 7B, 30" de la figura 9, y 90 de las figuras 13A y 13B son del tipo más preferible, pero otras realizaciones también se encontrarán dentro del alcance de la invención. La figura 15 ilustra tales células 30 de flujo en las que la zona Z1 de adquisición de parámetros en el elemento 31 tiene una sección transversal elíptica (es decir, ovalada) de diámetro mayor  $W''$  y se ensambla dentro de, y se alinea mediante, la parte 52 plana con un elemento 37 prismático de cuatro lados de modo que al menos una superficie 50 óptica del mismo es paralela al diámetro mayor de Z1 antes de la formación de la unión 39 óptica. En cuanto al canal de flujo rectangular en la célula 31 de flujo prismática de la figura 14, tales canales de flujo no circulares ejercen una fuerza de rotación sobre cuerpos formados asimétricos (por ejemplo, BC5) tal como para orientarlos de manera preferente en una corriente de muestra; tales canales pueden proporcionarse mediante el mismo procedimiento de formación de vidrio usado para producir las células de flujo prismáticas comentadas en el presente documento como elemento 31, 31' o 31'' en las diversas figuras, es decir, según la discusión de las figuras 8A y 8B con el uso de un mandril elíptico con respecto al cual se forma de manera apropiada la parte 52 plana. Tales canales rectilíneos que se extienden axialmente que tienen una relación de aspecto en sección transversal, es decir, de diámetros mayor con respecto a menor, de aproximadamente 2,5 pueden producirse de este modo; se ha demostrado el carácter práctico de células de flujo experimentales que tienen dimensiones de canal de 105x240 micrómetros. Tal como se indica en la discusión de la célula 90 de flujo de la figura 13, para las células 30, 30' o 30" de flujo anteriormente mencionadas que tienen envueltas prismáticas, predomina la refracción en la superficie de contacto vidrio/aire, minimizándose la refracción no axisimétrica mediante superficies planas paralelas de la envuelta y el paso 32, 32' o 32'' prismático; para tales ventanas la superficie de contacto líquido/vidrio de la zona Z de adquisición de parámetros aporta una pequeña contribución a la refracción a través de la pared de célula de flujo. En cambio, la refracción en la superficie de contacto vidrio/aire de la célula 90 de flujo se minimiza mediante la envuelta de célula de flujo esférica, y predomina preferiblemente la refracción en la superficie de contacto líquido/vidrio de Z, minimizándose la refracción no axisimétrica mediante un canal de flujo prismático tal como para las células 30, 30' o 30" de flujo. Sin embargo, la célula 30 de flujo de la figura 15 difiere de estas últimas células de flujo en que tiene una zona Z1 de adquisición de parámetros dentro de su paso de flujo que no es prismática. Tal como se sugiere en la discusión de la célula 30 de flujo de la figura 14, la curvatura de la superficie de la zona Z1 de adquisición de parámetros provoca refracción no axisimétrica que afecta a los parámetros ópticos resultantes del haz de láser de interrogación B; en el plano perpendicular al eje de flujo y que contiene el eje óptico OA, tal refracción es inversamente proporcional al radio del círculo de contacto tangente a la superficie de Z en el punto a través del cual pasa el eje óptico OA. Por tanto, debido al círculo de contacto de gran radio en tal punto en la figura 15, los parámetros ópticos adquiridos en o cerca del eje óptico OA en la figura 15 pueden tener refracción no axisimétrica aceptable en varias aplicaciones citométricas, particularmente dado el mejor control de la geometría de canal que puede lograrse mediante el procedimiento de estiramiento más frío mediante el cual puede producirse el elemento 31. Además, el análisis simplemente óptico de muestras citométricas que contienen cuerpos formados asimétricos puede beneficiarse más de las fuerzas de orientación ventajosas aplicadas a dichos cuerpos que padecer de los efectos de tal refracción no axisimétrica; porque tal refracción en la célula 30 de flujo de la figura 15 es relativamente insensible al ángulo de cuña  $\alpha$  de la figura 6, algunas aplicaciones citométricas pueden beneficiarse de la eliminación de la unión 39 óptica en la misma, es decir, proporcionando un elemento 31 más grande la envuelta solidaria mecanizada de una célula de flujo auténticamente monolítica en vez de una envuelta alineable independiente mediante el elemento 37. De manera menos preferible, pero de valor posible para su uso en instrumentos de menor coste, Z1 puede tener una sección transversal con una relación de aspecto igual a 1,0, es decir, ser circular en vez de elíptica tal como se ilustra en la figura 15; los elementos monolíticos cilíndricos para su uso en células de flujo con tales relaciones de aspecto bajas pueden producirse sin usar el mandril requerido para el elemento 31 de la figura 15 y son insensibles a la rotación del elemento 37 durante el ensamblaje y la unión. Si se prefiere, la célula 30 de flujo de la figura 15 de cualquier relación de aspecto en sección transversal de canal puede procesarse adicionalmente para dar una célula de flujo para su uso en instrumentación análoga a la de la figura 3, modificando el paso en el elemento 31 para formar un conducto de volúmetro de Coulter tal como se describió.

Una variedad de instrumentación citométrica, ya adquiera sólo parámetros caracterizantes ópticos como en la figura 11 o adquiera parámetros caracterizantes tanto ópticos como de Coulter como en la figura 3, puede beneficiarse de la inclusión de otras realizaciones de célula de flujo fabricadas en diversas configuraciones que pueden producirse mediante el método de la invención. Tales células de flujo pueden tener más o menos ventanas que las comprendidas en los ejemplos anteriormente mencionados, es decir, células de flujo que tienen secciones transversales poligonales alineadas similares a través de la porción de adquisición de parámetros de sus pasos de muestra y sus envueltas tal como se describió anteriormente pero que tienen, por ejemplo, tres, cinco, siete o más ventanas dispuestas según puede ser adecuado para una aplicación citométrica particular; dichas secciones transversales poligonales no necesitan ser regulares. Tales células de flujo pueden comprender elementos producidos a partir de vidrios distintos de una forma de sílice, dos o más elementos producidos a partir de diferentes tipos de vidrio, un material de unión óptica elegido para minimizar la desigualdad de refracción a través de las uniones ópticas, o un material de este tipo elegido para optimizar una propiedad no óptica de los componentes de célula de flujo alineados y fijados. Las envueltas de células de flujo fabricadas mediante el método de la invención tampoco tienen que ser anularmente completas para encerrar circunferencialmente el elemento monolítico cilíndrico, ni tales elementos de adaptación tienen que usarse de manera individual, es decir, pueden usarse porciones de dos o más elementos de adaptación anulares de diferentes materiales o secciones (longitudinales y/o transversales) con un elemento monolítico cilíndrico dado según pueda requerirse para cumplir con una aplicación citométrica específica. Se entiende que pueden producirse células de flujo mediante el método de la invención que comprenden

elementos monolíticos cilíndricos que tienen pasos no prismáticos, incluyendo los de sección transversal circular; tales células de flujo producen refracción no axisimétrica en la superficie curva de la zona de adquisición de parámetros en sus pasos, pero son útiles en realizaciones de instrumentos útiles en aplicaciones citométricas menos exigentes.

5 Las preformas producidas y estiradas tal como se describió anteriormente, pero que comprenden menos revestimientos y que tienen un diámetro externo menor tras el procedimiento de estiramiento, proporcionan ventajas cuando se adaptan a otros usos en instrumentación ilustrada en las figuras 3 u 11. Tales preformas no necesitan ser ni ópticamente transparentes ni aislantes y pueden formarse de vidrios distintos de sílice que, sin embargo, es  
10 preferible. Por ejemplo, los conjuntos de transductor en estas últimas figuras se basan en un tubo de entrada de muestra (por ejemplo, el tubo 56 de introducción de la figura 3) para inyectar muestras preparadas en líquido S1 de recubrimiento en la cámara del elemento 34 de tapa para su paso a través de la zona Z o Z" de adquisición de parámetros respectiva de la célula 30 ó 30" de flujo. Tales tubos se producen convencionalmente a partir de tubos  
15 comerciales, tolerancias en el canal de los mismos provocan variabilidad entre unidades de flujos de muestra a través de tales zonas de adquisición de parámetros (porción superior de la tabla 2). Se ha encontrado posible mediante los métodos de formación de vidrio anteriormente descritos mejorar significativamente el control sobre las dimensiones de pasos a través de elementos monolíticos cilíndricos; como resultado de trabajo que conduce al presente documento, la producción de células de flujo según la patente '187 tienen tales dimensiones con tolerancias de  $\pm 2$  micrómetros ( $\pm 0,000201$  cm,  $\pm 0,000079$  pulgadas). Tolerancias similares en canales de flujo en  
20 tubos de entrada de muestra reducen significativamente la variabilidad entre unidades en las velocidades de flujo volumétrico de muestra a través de zonas de adquisición de parámetros. Se fabricaron tubos de entrada de muestra de prototipo a partir de preformas producidas para tener una relación de aspecto de canal de flujo de 1,0 tal como se describe con respecto a la figura 15, un D.I. de canal tras el estiramiento de  $(0,01311 \pm 0,00127)$  cm o  $(0,00516 \pm 0,0005)$  pulgadas, y un diámetro externo (D.E.) de  $(0,154 \pm 0,0010)$  cm o  $(0,061 \pm 0,0004)$  pulgadas; a segmentos  
25 cortados hasta una longitud de  $(1,461 \pm 0,013)$  cm o  $(0,575 \pm 0,005)$  pulgadas para tener extremos perpendiculares al eje de canal y estar libres de astillas alrededor del borde de canal se les proporcionó una sección decreciente de tronco de cono a un ángulo de  $(22,5 \pm 2,5)^\circ$  hasta un diámetro menor de  $(0,051 \pm 0,008)$  cm o  $(0,020 \pm 0,003)$  pulgadas en el extremo de salida. Montados de manera sellada en el elemento 34 de tapa en las figuras 3 u 11 y acoplados por conexión de fluido al orificio P1, tales tubos reducen la variabilidad en los flujos de muestra volumétricos a través de la zona Z o Z" de adquisición de parámetros respectiva de las células 30 ó 30" de flujo en  
30 aproximadamente un 80% (porción inferior de la tabla 2). Tales tubos de introducción de muestra facilitan una mayor estabilidad tanto en el diámetro como en la posición espacial del núcleo de muestra en flujo hidrodinámicamente enfocado, reduciendo así los coeficientes de variación en parámetros caracterizantes adquiridos mediante la interacción de cuerpos formados con un haz de radiación de interrogación de perfil gaussiano. Para algunas  
35 aplicaciones puede resultar ventajoso combinar las funciones del tubo 56 de entrada y el orificio P1 en un único componente 56/P1 de entrada tubular, es decir, el propio tubo 56 de entrada sirve como elemento de conexión mediante el cual se acoplan flujos de muestra preparados por conexión de fluido al interior de la cámara en el elemento 34 de tapa. En tales casos un bisel pequeño no crítico en el D.E. del extremo de entrada resulta ventajoso. Tales tubos de entrada de múltiples funciones también pueden proporcionar la regulación de flujo volumétrico de los  
40 de propósito individual descritos en el presente documento.

Tabla 2. Comparación de tubos de entrada producidos a partir de tubos comerciales y a partir de preformas de sílice estiradas tal como se describe en esta solicitud, teniendo ambos la geometría descrita en el texto adjunto y una longitud de canal cilíndrico de  $(1,461 \pm 0,013)$  cm o  $(0,575 \pm 0,005)$  pulgadas. La variación de D.I. del tubo de  
45 entrada estirado es del 16% de la del tubo de entrada producido a partir de tubos comerciales; de ese modo la variación en la velocidad de flujo volumétrico de muestra a un diferencial de presión de 62,1 kPa o 9,0 psi (libras por pulgada al cuadrado) se reduce hasta el 19,4% de la observada con tubos de entrada producidos a partir de tubos comerciales. En esta tabla, 0,00550 pulgadas es igual a 0,01397 cm, 0,00500 pulgadas a 0,01270 cm, 0,00450 pulgadas a 0,01143 cm, 0,00100 pulgadas a 0,00254 cm, 0,00524 pulgadas a 0,01331 cm,  
50 0,00516 pulgadas a 0,01311 cm, 0,00508 pulgadas a 0,01290 cm, y 0,00016 pulgadas a 0,00041 cm.

Tubo 56 de entrada	Tolerancia de D.I.	D.I., pulgadas	Flujo, $\mu$ l/s
	Máximo	0,00550	31,081
Tubos comerciales	Nominal	0,00500	21,044
	Mínimo	0,00450	13,688
Variación permitida total		0,00100	17,393
	Máximo	0,00524	25,608
Preforma de sílice estirada	Nominal	0,00516	23,870
	Mínimo	0,00508	22,230
Variación permitida total		0,00016	3,378

55 Con respecto a las células de flujo ilustradas en las figuras 14 y 15 se observó que algunos canales de flujo no circulares ejercen una fuerza de rotación de orientación sobre cuerpos formados asimétricos para orientarlos de manera preferente en una corriente de muestra. La probabilidad de que un cuerpo formado asimétrico, por ejemplo, un eritrocito, pase a través del centro de la zona Z de adquisición de parámetros de la célula 30 de flujo de la figura 3

o la célula 30" de flujo de la figura 11 en una orientación particular con respecto al haz de interrogación B, por ejemplo, con una cara discoide perpendicular a dicho haz, sigue una distribución uniforme que depende de la tolerancia aceptable para tal relación espacial, es decir, si tal tolerancia es de  $\pm 10^\circ$  para que la cara discoide esté realmente perpendicular a tal haz, entonces la probabilidad es de  $(20^\circ/360^\circ)$ , o del 5,5%, de que se produzca tal orientación particular. Para elementos 31 de célula de flujo experimental que tienen los pasos rectangular o elíptico de las figuras 14 ó 15 de aproximadamente 12 mm de longitud, aproximadamente el 17% de los eritrocitos se rotaron dentro de  $\pm 10^\circ$  de la perpendicularidad con respecto al eje óptico del haz de láser de interrogación B cuando dicho haz atravesó la dimensión menor de los canales de flujo respectivos. Este resultado indica una reducción del 68% de la aleatoriedad de la orientación de eritrocitos alrededor del eje de flujo; mediante reducción de los coeficientes de variación de parámetros caracterizantes ópticos, tal orientación mejorada de cuerpos formados asimétricos ofrece ventajas en un gran número de aplicaciones citométricas y puede obtenerse fácilmente en células de flujo fabricadas mediante el método de la presente invención. Para el tubo 56 de entrada de la figura 3 comentado anteriormente, no se aplica tal fuerza de orientación, y la probabilidad de que un cuerpo formado asimétrico, por ejemplo, un eritrocito, salga del mismo y pase a través del centro de una zona Z de adquisición de parámetros circular o prismática no regular de una célula de flujo dentro de  $\pm 10^\circ$  de tal orientación específica también es de aproximadamente el 5,5%.

La orientación aleatoria de cuerpos formados asimétricos alrededor del eje de flujo da como resultado coeficientes de variación aumentados en sus parámetros caracterizantes ópticos adquiridos. La probabilidad de que un cuerpo formado de este tipo transite por la zona Z de adquisición de parámetros de una célula de flujo en una orientación preferida puede aumentarse significativamente, mientras que se conserva un control mejorado de flujos de muestra volumétricos, mediante modificaciones geométricas del tubo 56 de entrada anteriormente mencionado. Tales mejoras aplican una fuerza de rotación a cuerpos formados asimétricos en tales flujos de muestra de modo que un mayor número de los mismos pasan unos tras otros a través de la zona de adquisición de parámetros de una célula de flujo en una orientación preferida. Por tanto, además de regular flujos volumétricos de muestra a través de zonas de adquisición de parámetros, los tubos de entrada de muestra que comprenden tales mejoras orientan de manera preferente cuerpos formados no axisimétricos en tales flujos durante su paso a través de tales zonas. Estas mejoras combinadas se obtienen independientemente de la sección transversal de la zona de adquisición de parámetros en la célula de flujo y, con alineación apropiada con tales zonas que comprenden secciones transversales de relación de aspecto distinta de la unidad suficiente, puede hacerse que tales tubos de entrada interaccionen de manera sinérgica con fuerzas de orientación que se originan en pasos de flujo que tienen relaciones de aspecto distintas de la unidad, por ejemplo, las zonas Z o Z1 de parámetros rectangulares o elípticas de las células 30 de flujo en las figuras 14 ó 15. Tal interacción sinérgica puede reducir adicionalmente la aleatoriedad en la presentación de cuerpos formados asimétricos frente al haz de radiación de interrogación, reduciendo así adicionalmente los coeficientes de variación en parámetros caracterizantes ópticos de los mismos adquiridos con conjuntos de transductor que comprenden tanto tubos de entrada como células de flujo que tienen pasos de flujo que tienen secciones transversales de relación de aspecto distinta de la unidad.

Las figuras 16A y 16B respectivas ilustran tubos 100 y 100' de entrada fabricados a partir de preformas producidas y estiradas según los métodos descritos anteriormente, pero para los que partes 102 ó 102' planas inclinadas pulidas opuestas han remplazado al tronco de cono comentado con respecto al tubo 56 de entrada de la figura 3. Las dimensiones del canal 108 ó 108' de flujo pueden adaptarse a las necesidades de una aplicación citométrica tal como se conoce en la técnica de restrictores de flujo. El resto de la superficie 106 ó 106' cilíndrica se extiende hasta la punta 104 ó 104' de salida, y se entenderá que dichas partes planas son simétricas alrededor del eje de los tubos 100 ó 100' de entrada. Las partes 102 ó 102' planas se forman a un ángulo con respecto al eje de tubo de entre  $20^\circ$  y  $25^\circ$ ; para velocidades de flujo de recubrimiento usadas en instrumentación tal como se ilustra en la figura 3, dicho ángulo es lo más preferiblemente de aproximadamente  $22,5^\circ$ , mientras que un ángulo de aproximadamente  $21^\circ$  es más preferible a velocidades de flujo de recubrimiento superiores, por ejemplo, tal como se usa normalmente en instrumentación ilustrada en la figura 11. Todos los demás detalles geométricos y dimensiones son tal como se comentaron para el tubo 56 de entrada de la figura 3. Los tubos 100 y 100' de entrada están montados de manera sellada en el elemento 34 de tapa de las figuras 3 u 11 respectivas y acoplados por conexión de fluido al orificio P1, estando las partes 104 ó 104' planas posicionadas para aplicar fuerzas de orientación de fluido a cuerpos formados asimétricos para hacerlos rotar alrededor del eje del canal 108 ó 108' a una relación espacial preferida con respecto al haz de radiación de interrogación B, por ejemplo, si se prefiere que los eritrocitos pasen a través de tal haz con una cara discoide perpendicular al haz, el borde largo de dichas partes planas debe ser perpendicular al haz. En la figura 16A el canal 108 es cilíndrico y surge a través de la parte 104 plana como una salida circular; aproximadamente el 44% de los eritrocitos que surgen a partir de tales salidas pueden orientarse con una cara discoide perpendicular dentro de aproximadamente  $\pm 10^\circ$  con respecto al haz de interrogación B cuando se remplazan tales tubos de entrada experimentales en instrumentación por lo demás análoga a la ilustrada en la figura 3, es decir, aproximadamente ocho veces más que los que se espera que se orienten de esa manera con el tubo de entrada comparativo que tiene la punta de salida conformada como el tronco de cono descrito anteriormente. Para puntas de entrada que tienen la parte 104' plana de salida reducida hasta el grosor mínimo permitido mediante astillado perjudicial, aproximadamente diez veces más de tales eritrocitos se orientaron de esa manera que con tubos de entrada que tenían el tronco de cono anteriormente mencionado; las partes 102' planas, producidas de este modo, se intersecan con y retiran parcialmente la pared de canal de tales tubos de entrada en la salida de tubo, por ejemplo, tal como se ilustra para el canal 108' rectangular en la figura 16B. Para una orientación óptima de cuerpos

5 formados asimétricos, las partes 102 ó 102' planas deben ser simétricas alrededor del eje de canal, y los bordes de tales partes 104 ó 104' planas y punta deben estar libres de astillas. Los tubos de entrada anteriormente mencionados que tienen puntas de cualquier geometría y están libres de astillas en el borde de salida del canal 108 ó 108' proporcionaron una reducción repetible de la variabilidad en las velocidades de flujo volumétrico de muestra tal como se indicó anteriormente.

10 También pueden fabricarse tubos de entrada a partir de preformas producidas tal como se describe para células de flujo comentadas en relación con la figura 14, excepto porque sólo comprenden uno o dos revestimientos para formar un elemento monolítico cilíndrico estirado (es decir, una célula de flujo prismática) que tiene un diámetro externo adecuado. Los tubos de entrada experimentales, producidos a partir de tales preformas y dotados de un tronco de cono en el extremo de salida tal como se describió anteriormente, orientaron de manera estimada el 24% de eritrocitos dentro de  $\pm 10^\circ$  de la perpendicularidad con respecto a un haz de láser de interrogación B cuando se sometieron a prueba tubos de entrada de prototipo en instrumentación por lo demás análoga a la ilustrada en la figura 11. Otros tubos de entrada experimental producidos del mismo modo, pero que tenían un canal elíptico uniforme tal como se comentó con respecto a la figura 15, orientaron de manera estimada el 27% de eritrocitos cuando se sometieron a prueba de manera similar. Sin embargo, tubos de entrada experimentales que tenían tales canales o bien rectangulares o bien elípticos orientaron aproximadamente el 57% de eritrocitos cuando se aplanaron las puntas de salida de tubo tal como se ilustra en la figura 16A, pero aproximadamente el 62% de tales cuerpos formados cuando se aplanaron las puntas de salida de tubo hasta un grosor mínimo tal como se ilustra en la figura 16B. Que las partes 102 ó 102' planas sean asimétricas y todos los bordes de punta estén libres de astillas es crucial para la orientación repetible de los eritrocitos asimétricos. Tubos de entrada aceptables que tenían cualquiera de las geometrías de punta anteriormente mencionadas proporcionaron la reducción esperada de la variabilidad en las velocidades de flujo volumétrico de muestra.

25 Para ilustrar todavía otras formas de tubos de entrada, las figuras 17, 18A y 18B aíslan la porción del conjunto T de transductor de la figura 3 que es contigua a la célula 30 de flujo; referencias en las mismas iguales a las de figuras anteriores indican partes iguales. Tal como se ha comentado, se adquieren parámetros caracterizantes V y/o C de Coulter mediante el electrodo 40 de la figura 17 en la cámara del elemento 34 de tapa, el electrodo 38 en la cámara del elemento 35 de tapa, y conjunto 41 de circuitos de CC/RF al que están conectados operativamente ambos de dichos electrodos. En las figuras 18A y 18B, los tubos 110 ó 110' de entrada respectivos portan elementos 114 ó 114' conductores cilíndricos que están en contacto mediante conexión de fluido y conectados operativamente al conjunto de circuitos de CC/RF de la figura 17 para funcionar como electrodo 40, mientras que los tubos 120 ó 120' de salida respectivos portan elementos 124 ó 124' conductores cilíndricos en contacto de manera similar y conectados para funcionar como electrodo 38 de la figura 17. Tales elementos conductores pueden ser cualquier forma preferida de las muchas formas conocidas en la técnica de electrodos, por ejemplo, tubos de paladio de dimensiones apropiadas unidos a los tubos de conexión de fluido, lámina de platino aplicada de manera apropiada, o emulsión conductora recocida sobre los mismos. Las estructuras 110/114 y 120/124 de función doble ilustradas en la figura 18A proporcionan una mejor regulación de flujo volumétrico a través de la zona Z de adquisición de parámetros de la célula 30 de flujo y por tanto se prefieren; sin embargo, la configuración de campo eléctrico proporcionada por las estructuras análogas en la figura 18B puede ser ventajosa en algunas aplicaciones citométricas. Con cualquiera de las estructuras de la figura 18A o 18B, la muestra preparada a partir de la válvula DV de distribución de la figura 17 entra en el conjunto T de transductor a través del orificio P1, que está acoplado por conexión de fluido al tubo de entrada, por ejemplo, los tubos 110 ó 110' de entrada en la figura 18A o 18B. El tubo 110 ó 110' de entrada inyecta la muestra 74 preparada desde el canal C1 o C1' al interior del líquido S1 de recubrimiento en la cámara en el elemento 34 de tapa, y el flujo hidrodinámicamente enfocado transporta los cuerpos formados en el mismo a través de la zona Z de adquisición de parámetros en el paso 32 de la célula 30 de flujo tal como se describió. El flujo 74 compuesto desde la zona Z de detección entra en el líquido S2 de recubrimiento en la cámara en el elemento 35 de tapa, se arrastra en el líquido de recubrimiento, entra en el canal C2 o C2' en el tubo 120 ó 120' de salida, y sale del conjunto de transductor a través del orificio P4 de la figura 17 al residuo tal como se describió. El patrón de flujo interno que acaba de resumirse se facilita por el tronco 122 ó 122' de cono en los tubos 110 ó 110' de entrada, que actúa para evitar que el flujo de recubrimiento se separe en la punta de tubo, y por el rebaje 122 ó 122' cónico en la punta de los tubos 120 ó 120' de salida, que actúa para guiar el flujo al interior del canal C2 o C2'. El tubo 110 de entrada en la figura 18A puede ser tal como se describió con respecto a la tabla 2 anterior, o uno de los descritos con respecto a las figuras 16A-16B y los tubos de entrada de orientación; es preferible que el tubo 110' de entrada en la figura 18B sea geoméricamente similar al tubo 110 de entrada, pero que tenga un canal compatible con el elemento 114' conductor deseado y cualquier espacio libre de unión requerido. La geometría y dimensiones de los tubos 120 ó 120' de salida son menos críticas que para los tubos 110 ó 110' de entrada. Para evitar la interferencia mediante la generación de burbujas electrolíticas en el extremo del elemento 114 ó 114' y 124 ó 124' conductor, es importante que tales extremos se aíslen mediante una perla de material 116 ó 116' y 126 ó 126' aislante. Los conjuntos T de transductor que comprenden estructuras que combinan funciones de fluido/electrodo tal como se describe en el presente documento se ensamblan más fácilmente y proporcionan parámetros caracterizantes V y/o C de Coulter de cuerpos formados que son iguales o superan en cuanto a la calidad a los proporcionados mediante componentes funcionales independientes convencionales.

65 Un método preferido para diferenciar cuerpos formados en una suspensión líquida usando tubos de introducción (o entrada) de muestra de la invención comprende las etapas de: a) proporcionar un tubo de introducción (o entrada)

de muestra del tipo descrito en el presente documento que comprende un canal de flujo que aplica una fuerza de rotación a cuerpos formados asimétricos en tales suspensiones líquidas; b) posicionar y fijar tal tubo de entrada de muestra en dicho conjunto de transductor con respecto al eje óptico de un haz de interrogación de modo que cuerpos formados asimétricos en tales suspensiones líquidas se orientan de manera preferente con respecto a dicho eje óptico; c) hacer pasar tales suspensiones líquidas a través de una porción de adquisición de parámetros del paso de flujo en una célula de flujo óptico mientras se irradian cuerpos formados en las mismas con un haz de radiación que pasa a través de una pared de dicha célula de flujo; y d) detectar diferentes parámetros ópticos de los cuerpos formados irradiados a través de otras tales paredes. Preferiblemente, el canal de flujo en tal tubo de entrada de muestra tiene una sección transversal uniformemente rectangular o elíptica. Tal célula de flujo tiene preferiblemente al menos tres paredes diferenciadas (o ventanas) a través de dos de las cuales pueden detectarse parámetros de diferenciación ópticos de cuerpos formados en la zona de adquisición de parámetros y, tras irradiar cuerpos formados en la misma con un haz de radiación que pasa a través de una primera pared, puede detectarse la radiación de dispersión directa a partir de los cuerpos formados irradiados a través de una segunda pared y pueden detectarse características de fluorescencia de los cuerpos formados irradiados a través de una tercera pared. Para aplicaciones citométricas que implican señales ópticas de baja intensidad, un segundo elemento que tiene una envuelta que comprende una superficie no cilíndrica de revolución, por ejemplo, una superficie esférica, es altamente preferible. Lo más preferiblemente, al menos algunas de las mediciones ópticas anteriormente mencionadas se combinan con mediciones de volumen V y/o conductividad C de Coulter realizadas simultáneamente en los cuerpos formados irradiados que pasan unos tras otros a través del canal de flujo. Tales parámetros de diferenciación se correlacionan mediante algoritmos convencionales para proporcionar información de diagnóstico deseada.

A partir de la descripción anterior, se apreciará que se ha proporcionado una célula de flujo óptico nueva y mejorada. Al estar compuesta por elementos monolíticos cilíndricos que ofrecen un mejor control sobre la geometría de canal y elementos alineables independientes que tienen una envuelta óptica preferida, se minimizan todas las desventajas anteriormente indicadas de procedimientos de formación de vidrio y mecanizado usados para fabricar células de flujo óptico monolíticas tal como se indica en la tabla 1 y pueden aumentarse los rendimientos de células de flujo aceptables, reduciendo así los costes y procedimientos de selección durante el ensamblaje de células de flujo aceptables en conjuntos de transductor. Además, el método de fabricación usado para proporcionar las células de flujo a modo de ejemplo es aplicable de manera general a la fabricación de una amplia variedad de realizaciones de células de flujo ópticas. También se apreciará que los métodos de formación de vidrio descritos en el presente documento para la fabricación de tales elementos monolíticos cilíndricos se han adaptado para proporcionar tubos de introducción (o entrada) de muestra que reducen la variabilidad en flujos volumétricos de muestra a través de la zona de adquisición de parámetros de células de flujo óptico, permitiendo así la simplificación de sistemas fluidos que soportan el suministro de muestra a células de flujo óptico que tienen valor comercial.

El control de flujo volumétrico mejorado proporcionado por los elementos estirados anteriormente descritos también tiene otras aplicaciones ventajosas en la instrumentación tal como se ilustra en las figuras 3 y 11. Con referencia a la figura 17, en la que el conjunto T de transductor de la figura 3 se aísla junto con la bomba MP4 dosificadora para líquido S1 de recubrimiento, el restrictor FR de flujo proporciona un ejemplo; en dichas figuras caracteres de referencia iguales indican partes iguales. Durante el análisis de muestra, la bomba MP4 dosificadora debe proporcionar al orificio P2 un volumen controlado de líquido S1 de recubrimiento determinado mediante el flujo de muestra volumétrico desde la válvula DV de distribución a través del orificio P1 y el tubo 56 de entrada; esto se realiza con la válvula FV de purga abierta de modo que el flujo de líquido S1 de recubrimiento se regula mediante el restrictor FR de flujo. Sin embargo, la bomba MP4 dosificadora debe poder proporcionar un flujo significativamente mayor de líquido S1 de recubrimiento durante la purga tras el análisis requerida para despejar la cámara en el elemento 34 de tapa de la muestra que acaba de analizarse; después se abre la válvula FV de purga para evitar el restrictor FR de flujo. Un restrictor de flujo convencional es un segmento de tubos cilíndricos de polieterecetona (PEEK) comercial que tiene un D.I. de canal de  $(0,041 \pm 0,003)$  cm o  $(0,016 \pm 0,001)$  pulgadas y una longitud de  $(12,07 \pm 0,10)$  cm o  $(4,75 \pm 0,04)$  pulgadas; las propiedades de flujo se facilitan en la porción superior de la tabla 3; la porción inferior de la tabla 3 contiene datos similares para restrictores FR de flujo experimental fabricados a partir de un elemento monolítico cilíndrico estirado tal como se describió anteriormente para tener un D.I. de canal cilíndrico de  $(0,03048 \pm 0,00041)$  cm o  $(0,012 \pm 0,00016)$  pulgadas y una longitud de  $(3,810 \pm 0,013)$  cm o  $(1,500 \pm 0,005)$  pulgadas. Además del tamaño físico menos intrusivo, tales restrictores FR de flujo reducen la variabilidad en el flujo de recubrimiento volumétrico hasta aproximadamente una quinta parte de lo observado con el restrictor de flujo convencional. Se apreciará que tales restrictores FR de flujo pueden usarse para equilibrar las velocidades de flujo volumétrico de muestra y recubrimiento en flujo hidrodinámicamente enfocado a través de la zona Z o Z' de adquisición de parámetros en las figuras 3 u 11, proporcionando por tanto ventajosamente tanto control mejorado del flujo total a través de la zona de adquisición de parámetros como comportamiento dinámico de los sistemas de fluido de soporte. Además, algunas aplicaciones de la instrumentación ilustrada en las figuras 3 y 11 pueden beneficiarse si el tubo 58 de salida cilíndrico se fabrica a partir de un elemento monolítico cilíndrico apropiado producido mediante los métodos descritos en el presente documento.

Tabla 3. Comparación de restrictores de flujo de recubrimiento convencionales producidos a partir de tubos de PEEK comerciales y a partir de preformas de sílice estiradas tal como se describe en esta solicitud. La variación de D.I. del tubo restrictor estirado es del 16% de la del tubo restrictor producido a partir de los tubos comerciales; la variación

## ES 2 751 404 T3

en la velocidad de flujo volumétrico de recubrimiento a un diferencial de presión de 55,2 kPa o 8,0 psi (libras por pulgada al cuadrado) se reduce de ese modo hasta el 21,9% de la observada con tubos de entrada producidos a partir de los tubos comerciales. En esta tabla, 0,017 pulgadas es igual a 0,043 cm, 0,016 pulgadas a 0,041 cm, 0,015 pulgadas a 0,038 cm, 0,002 pulgadas a 0,005 cm, 0,01216 pulgadas a 0,03089 cm, 0,01200 pulgadas a 0,03048 cm, 0,01184 pulgadas a 0,03007 cm, 0,00032 pulgadas a 0,00081 cm.

Restrictor FR de flujo de recubrimiento	D.I. tolerancia	D.I., pulgadas	Flujo, $\mu\text{l/s}$
	Máximo	0,017	413,53
Tubos de PEEK comerciales	Nominal	0,016	321,75
	Mínimo	0,015	246,47
Variación permitida total		0,002	167,06
Preforma de sílice estirada	Máximo	0,01216	341,05
	Nominal	0,01200	328,38
	Mínimo	0,01184	304,51
Variación permitida total		0,00032	36,54

Las múltiples mejoras en los métodos y componentes descritos en el presente documento pueden comprenderse, de manera individual o en combinación, en instrumentación citométrica para proporcionar una función mejorada mientras que al mismo tiempo se reducen los costes durante la fabricación de componentes y el ensamblaje de los mismos. Por ejemplo, la instrumentación ilustrada en las figuras 3 u 11 comprende en el conjunto T o T' de transductor únicamente una célula 30 ó 30" de flujo según la invención, pero un tubo de entrada mejorado estructurado y fabricado según la presente invención tal como se describe con respecto a la tabla 2 o las figuras 16A y 16B puede reemplazar al tubo 56 de entrada en el conjunto T o T' de transductor; alternativamente, tal tubo de entrada mejorado puede usarse con una célula de flujo óptico de la técnica anterior que reemplaza a una célula 30 ó 30" de flujo en el conjunto T o T' de transductor. De manera similar, estructuras que combinan funciones de fluido y electrodo tal como se describen con respecto a las figuras 18A y 18B pueden usarse solas en T o T' o con cualquiera de las combinaciones anteriormente mencionadas de componentes de la invención. Además, un restrictor de flujo mejorado tal como se describe con respecto a la tabla 3 y la figura 17 puede ser beneficioso cuando se usa solo en el mecanismo 16 ó 16' dosificador en la instrumentación ilustrada en las figuras 3 u 11 respectivas, cuando se usa en otra instrumentación análoga a la misma con un conjunto T o T' de transductor mejorado que comprende o bien la célula de flujo o bien el tubo de entrada de la invención, o cuando se usa en aún otra instrumentación con un conjunto T o T' de transductor mejorado que comprende tanto la célula de flujo como el tubo de entrada de la invención. Finalmente, retrorreflexiones desde la cara de entrada de la célula 30 ó 30" de flujo usada en T o T' en cualquiera de las realizaciones anteriormente mencionadas pueden provocar posiblemente inestabilidad en el haz de láser de interrogación B; tal eventualidad puede evitarse haciendo rotar el conjunto de transductor en su estructura de soporte (no mostrada en las figuras 3 u 11) durante el ensamblaje de modo que una parte perpendicular a la cara de tales células de flujo a través de la cual entra el haz de láser está desviada aproximadamente un grado ( $1^\circ$ ) a la izquierda o a la derecha del eje óptico del láser o, menos preferiblemente, haciendo que el conjunto T o T' de transductor se incline de modo que tal parte perpendicular está desviada aproximadamente un grado ( $1^\circ$ ) por encima o por debajo de dicho eje. Otras combinaciones de métodos y componentes mejorados según la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica citométrica.

Un método preferido para diferenciar cuerpos formados en una suspensión líquida usando conjuntos de transductor de la invención comprende las etapas de: a) proporcionar una célula de flujo del tipo descrito en el presente documento que comprende al menos dos elementos producidos a partir de un material transparente aislante, siendo el primer elemento un elemento monolítico sustancialmente cilíndrico que incluye un paso de flujo interno sin interrupciones al menos una porción axial del cual está rodeada por una superficie continua de sección transversal preferiblemente no circular y teniendo el segundo elemento tanto una superficie cóncava adaptada a tal primer elemento como una envuelta externa óptica no cilíndrica de forma y orientación predeterminadas, estando dicho segundo elemento fijado a dicho primer elemento mediante una unión óptica para minimizar los efectos de refracción no axisimétricos en señales ópticas adquiridas a través de al menos tres paredes compuestas (o ventanas) entre superficies correspondientes de dicho paso y dicha envuelta a través de las cuales pueden adquirirse parámetros caracterizantes ópticos resultantes de la interacción de dichos cuerpos formados con un haz de radiación de interrogación; b) proporcionar un tubo de introducción (o entrada) de muestra del tipo descrito en el presente documento que comprende un canal de flujo que aplica una fuerza de rotación a cuerpos formados asimétricos en tales suspensiones líquidas; c) posicionar y fijar tal célula de flujo y/o tal tubo de entrada de muestra, de manera individual o en combinación, en dicho conjunto de transductor con respecto al eje óptico de un haz de interrogación de modo que se minimizan efectos de refracción no axisimétricos sobre la radiación que pasa a través de dichas paredes y/o tales cuerpos formados asimétricos se orientan de manera preferente con respecto a dicho eje óptico; d) hacer pasar tales suspensiones líquidas a través de una porción de adquisición de parámetros del paso de flujo mientras se irradian cuerpos formados en las mismas con un haz de radiación que pasa a través de una de tales paredes; y e) detectar diferentes parámetros ópticos de los cuerpos formados irradiados a través de otra de tales paredes. Preferiblemente, el canal de flujo en tal tubo de entrada de muestra tiene sección transversal uniformemente rectangular o elíptica. Tal célula de flujo tiene preferiblemente al menos tres paredes diferenciadas (o ventanas) a través de dos de las cuales pueden detectarse parámetros de diferenciación ópticos de cuerpos



5 formados en la zona de adquisición de parámetros y, tras irradiar cuerpos formados en la misma con un haz de radiación que pasa a través de una primera pared, puede detectarse la radiación de dispersión directa a partir de los cuerpos formados irradiados a través de una segunda pared y pueden detectarse características de fluorescencia de los cuerpos formados irradiados a través de una tercera pared. Para aplicaciones citométricas que implican señales ópticas de baja intensidad, un segundo elemento que tiene una envuelta que comprende una superficie no cilíndrica de revolución, por ejemplo, una superficie esférica, es altamente preferible. Lo más preferiblemente, al menos algunas de las mediciones ópticas anteriormente mencionadas se combinan con mediciones de volumen V y/o conductividad C de Coulter realizadas simultáneamente en los cuerpos formados irradiados que pasan unos tras otros a través del canal de flujo. Tales parámetros de diferenciación se correlacionan mediante algoritmos convencionales para proporcionar información de diagnóstico deseada.

10 La invención se ha descrito en detalle haciendo referencia a varias realizaciones específicas. Sin embargo, se apreciará que pueden existir diversos cambios y modificaciones más allá de los comentados en el presente documento. Por ejemplo, la totalidad de los segundos elementos de adaptación prismáticos en la discusión anterior de las nuevas células de flujo se ilustraron como con su núcleo extraído alrededor de su centro de masas a través de una superficie de extremo, pero no se necesita que las células de flujo fabricadas mediante el método de la invención tengan envueltas o ejes de adquisición de parámetros simétricos alrededor de sus pasos, es decir, puede extraerse el núcleo de un cubo de un vidrio preferido de esquina a esquina a lo largo de una diagonal mayor para aceptar el elemento monolítico cilíndrico, con una tercera esquina aplanada de manera apropiada para proporcionar una entrada para un haz de radiación de interrogación, proporcionando así seis orificios para la adquisición fuera del plano de parámetros caracterizantes de dispersión y/o fluorescencia.

15 Son posibles diferentes disposiciones de los componentes representados en los dibujos o descritos anteriormente, así como componentes y etapas no mostrados o descritos. De manera similar, algunas características y combinaciones secundarias son útiles y pueden emplearse sin referencia a otras características y combinaciones secundarias. Se han descrito realizaciones de la invención con fines ilustrativos y no restrictivos, y realizaciones alternativas resultarán evidentes para los lectores de esta patente. En determinados casos, pueden realizarse o ejecutarse etapas u operaciones de método en un orden diferente, o pueden añadirse, eliminarse o modificarse operaciones.

20

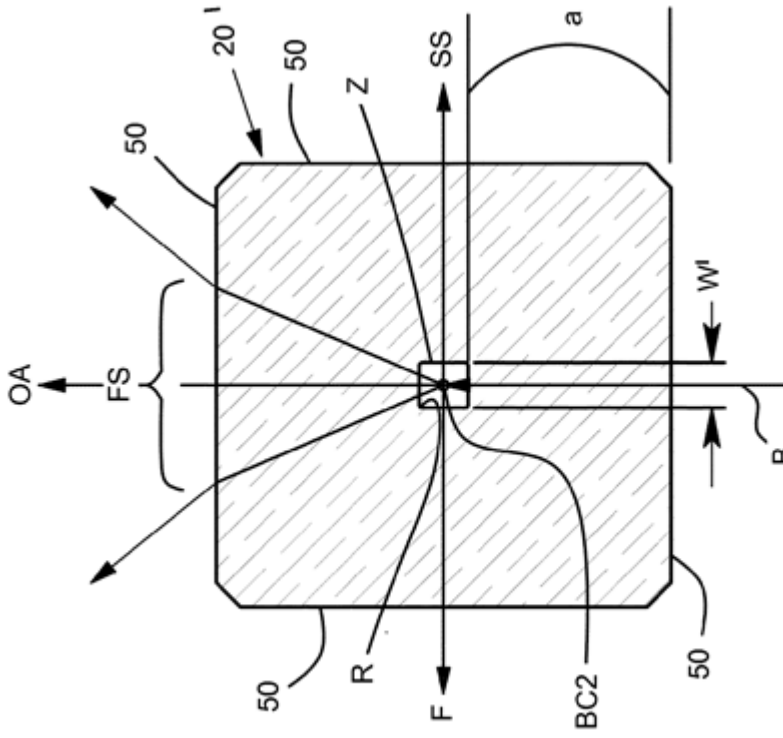
25

30

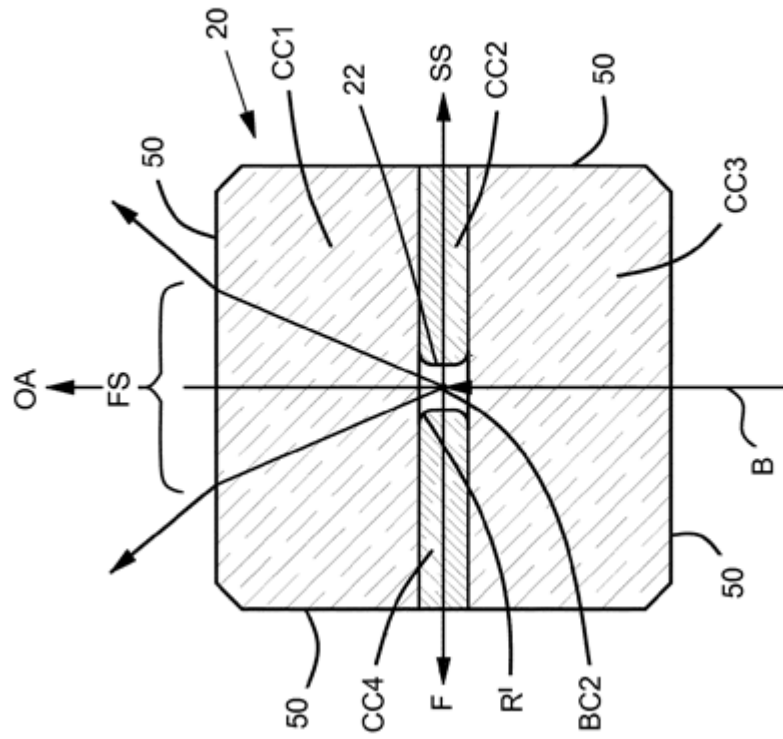
**REIVINDICACIONES**

1. Método para producir una célula (30, 30', 30'') de flujo óptico compuesta transparente del tipo usado para caracterizar cuerpos formados que pasan a través de la célula de flujo, teniendo la célula de flujo óptico formado en la misma un canal de flujo interno rectilíneo, comprendiendo el método las etapas de:
  - proporcionar una preforma (31, 31', 31'') monolítica cilíndrica que comprende un tubo de vidrio que tiene un canal (32, 32', 32'') que se extiende axialmente a través del mismo y una temperatura de transición, comprendiendo el canal una sección transversal original sustancialmente uniforme de una forma deseada;
  - calentar la preforma hasta una temperatura predeterminada por encima de la temperatura de transición del tubo de vidrio;
  - estirar axialmente la preforma a una velocidad controlada, durante un tiempo controlado y a una orientación angular constante, para lograr un área en sección transversal reducida deseada del canal que se extiende axialmente;
  - proporcionar un elemento (37, 37', 37'') óptico, comprendiendo el elemento óptico una superficie de adaptación que se adapta a un segmento de la preforma estirada;
  - ensamblar el elemento óptico sobre el segmento de modo que el elemento óptico y el segmento están en una relación espacial deseada; y
  - unir ópticamente el elemento óptico al segmento para fijar el elemento óptico y el segmento en la relación espacial deseada; caracterizado porque el elemento (37, 37', 37'') óptico comprende además una envuelta no cilíndrica exterior de forma y orientación predeterminadas con respecto a la superficie de adaptación; y porque en la etapa de ensamblar el elemento óptico sobre el segmento la superficie de adaptación del elemento óptico se posiciona para minimizar los efectos de refracción no axisimétricos sobre parámetros caracterizantes ópticos adquiridos a partir de cuerpos formados que pasan a través del área en sección transversal reducida del canal que se extiende axialmente.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la forma de la sección transversal del canal original es un círculo.
3. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el área en sección transversal reducida del canal que se extiende axialmente tiene una forma seleccionada del grupo que consiste en un cuadrado, un hexágono, un rectángulo y una elipse.
4. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la superficie de adaptación del elemento óptico tiene una forma seleccionada del grupo que consiste en un cuadrado, un hexágono, un rectángulo y una elipse.
5. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la envuelta exterior del elemento óptico tiene una forma en sección transversal seleccionada del grupo que consiste en un cuadrado, un rectángulo, un hexágono y un segmento circular.
6. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de unión comprende formar una unión (39) óptica entre el elemento óptico y el segmento, comprendiendo la unión óptica un material de unión óptica que es sustancialmente no fluorescente, y en el que el elemento óptico, la unión y el segmento tienen cada uno un índice de refracción respectivo, siendo los índices de refracción respectivos sustancialmente iguales.
7. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la temperatura predeterminada está dentro de un intervalo de entre 1.500°C y 1.750°C y la preforma monolítica cilíndrica tiene una viscosidad de estiramiento de entre  $6 \times 10^5$  Pa·s ( $6 \times 10^6$  poise) y  $1.000 \times 10^5$  Pa·s ( $1.000 \times 10^6$  poise).
8. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la superficie de adaptación del elemento óptico comprende una forma cóncava.
9. Célula (30, 30', 30'') de flujo óptico compuesta transparente del tipo usado para caracterizar cuerpos formados que pasan a través de la célula de flujo, comprendiendo la célula de flujo óptico:
  - una preforma (31, 31', 31'') monolítica cilíndrica axialmente estirada que tiene un canal (32, 32', 32'') que se extiende axialmente a través de la misma;
  - un elemento (37, 37', 37'') óptico que tiene una superficie de adaptación que se adapta a un segmento de la preforma monolítica cilíndrica axialmente estirada; y
  - una unión (39) óptica que fija la preforma monolítica cilíndrica axialmente estirada y el elemento óptico en una relación espacial deseada,

- 5 caracterizada porque la superficie de adaptación del elemento óptico está posicionada para minimizar los efectos de refracción no axisimétricos sobre parámetros caracterizantes ópticos adquiridos a partir de cuerpos formados que pasan a través del área en sección transversal del canal que se extiende axialmente de la preforma monolítica cilíndrica axialmente estirada; y porque el elemento (37, 37', 37'') óptico comprende además una envuelta no cilíndrica exterior de forma y orientación predeterminadas con respecto a la superficie de adaptación.
10. 10. Célula de flujo óptico según la reivindicación 9, en la que el canal que se extiende axialmente de la preforma axialmente estirada comprende un área en sección transversal que tiene una forma seleccionada del grupo que consiste en un cuadrado, un hexágono, un rectángulo y una elipse.
- 15 11. 11. Célula de flujo óptico según o bien la reivindicación 9 o bien la reivindicación 10, en la que la superficie de adaptación del elemento óptico tiene una forma seleccionada del grupo que consiste en un cuadrado, un hexágono, un rectángulo y una elipse.
- 20 12. 12. Célula de flujo óptico según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que la envuelta exterior del elemento óptico tiene una forma en sección transversal seleccionada del grupo que consiste en un cuadrado, un rectángulo, un hexágono y un segmento circular.
- 25 13. 13. Célula de flujo óptico según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en la que la unión óptica comprende un material de unión óptica que es sustancialmente no fluorescente, y en la que el elemento óptico, la unión y el segmento tienen cada uno un índice de refracción respectivo, siendo los índices de refracción respectivos sustancialmente iguales.
- 30 14. 14. Célula de flujo óptico según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en la que la superficie de adaptación del elemento óptico comprende una forma cóncava.
15. 15. Célula de flujo óptico según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en la que una característica de referencia del elemento óptico está espacialmente posicionada y alineada con respecto a una característica de referencia de la preforma estirada correspondiente a la relación espacial deseada entre la preforma y el elemento óptico.



**FIG. 1**  
(Técnica anterior)



**FIG. 2**  
(Técnica anterior)

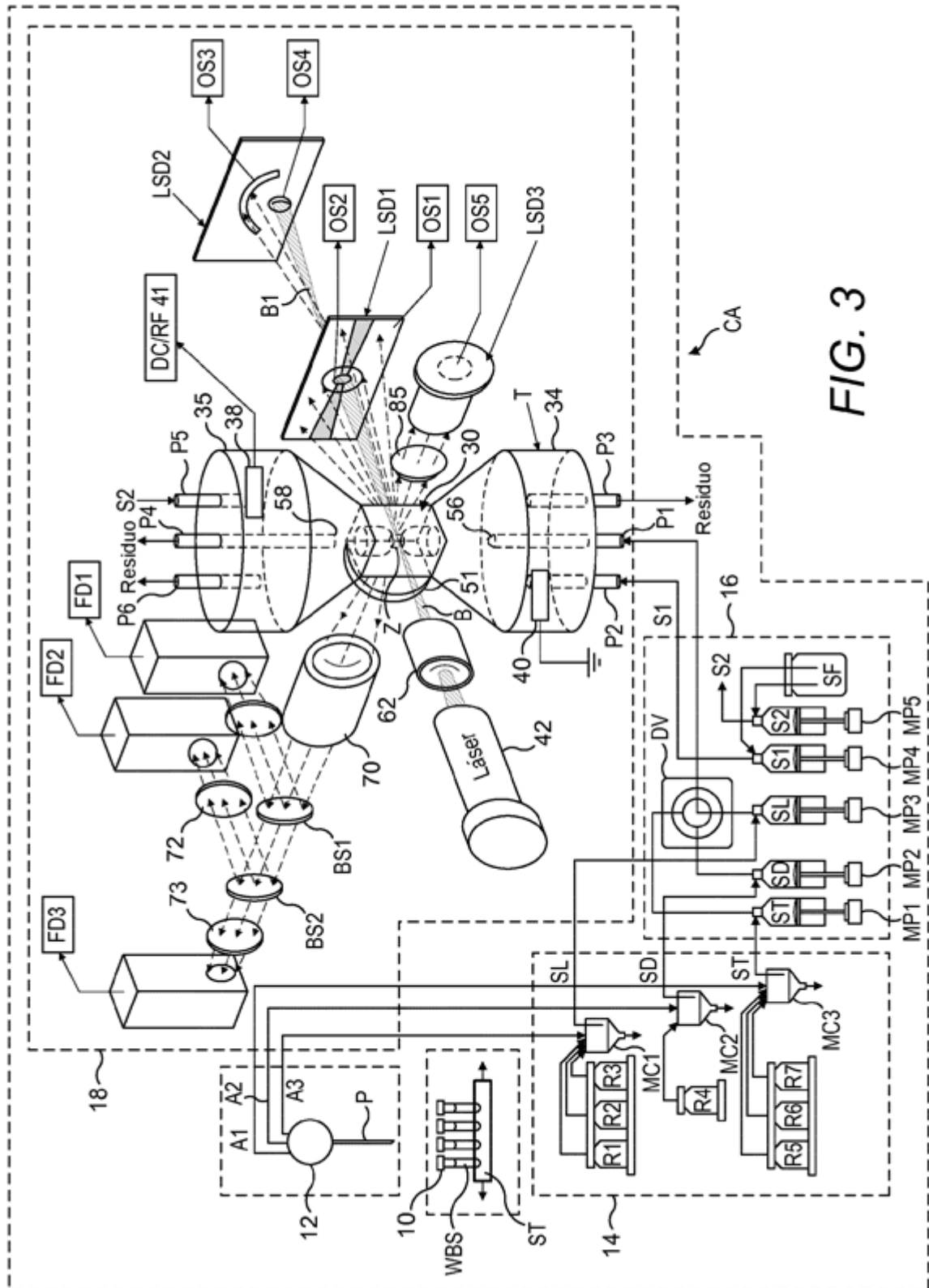


FIG. 3

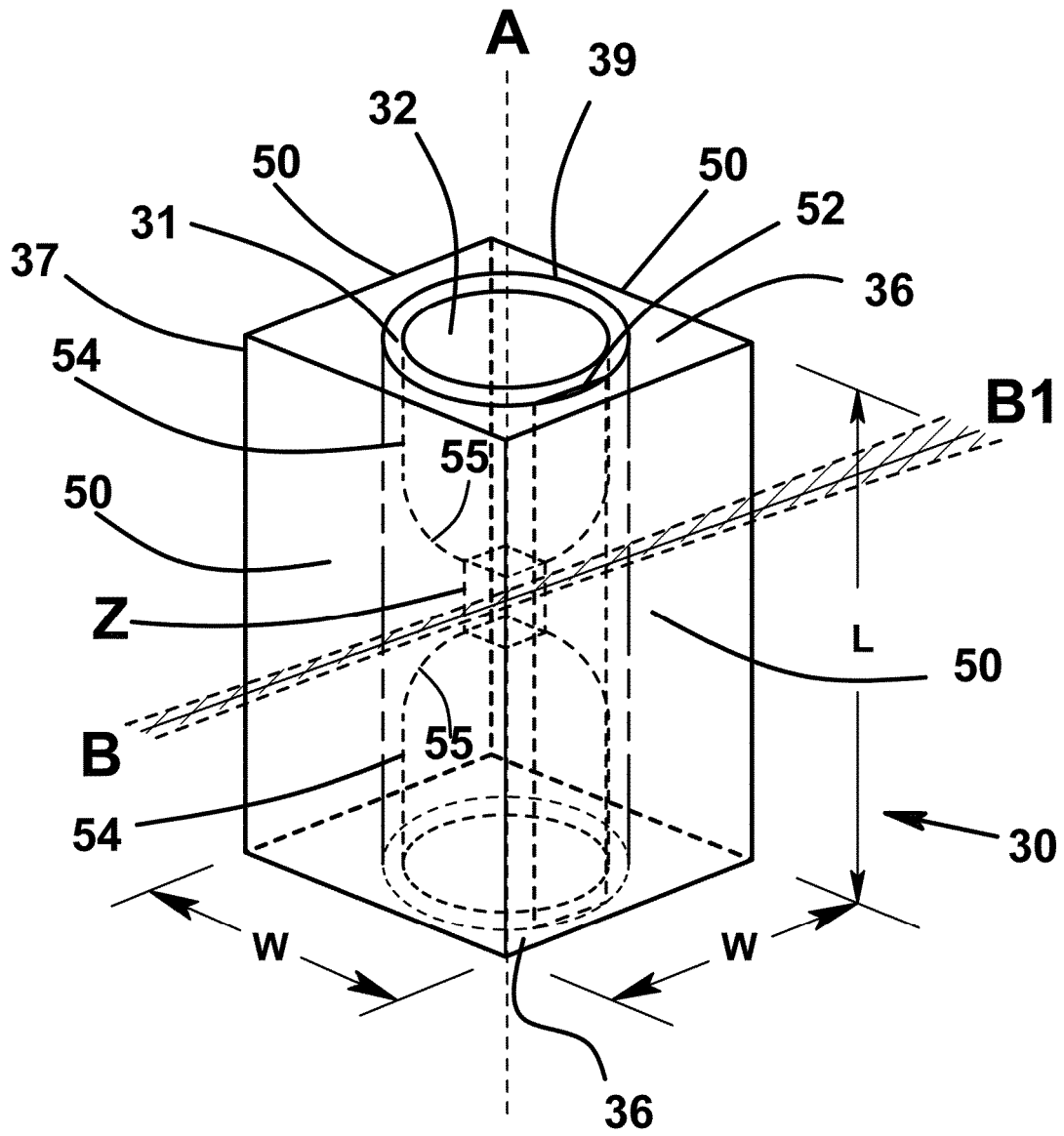


FIG. 4

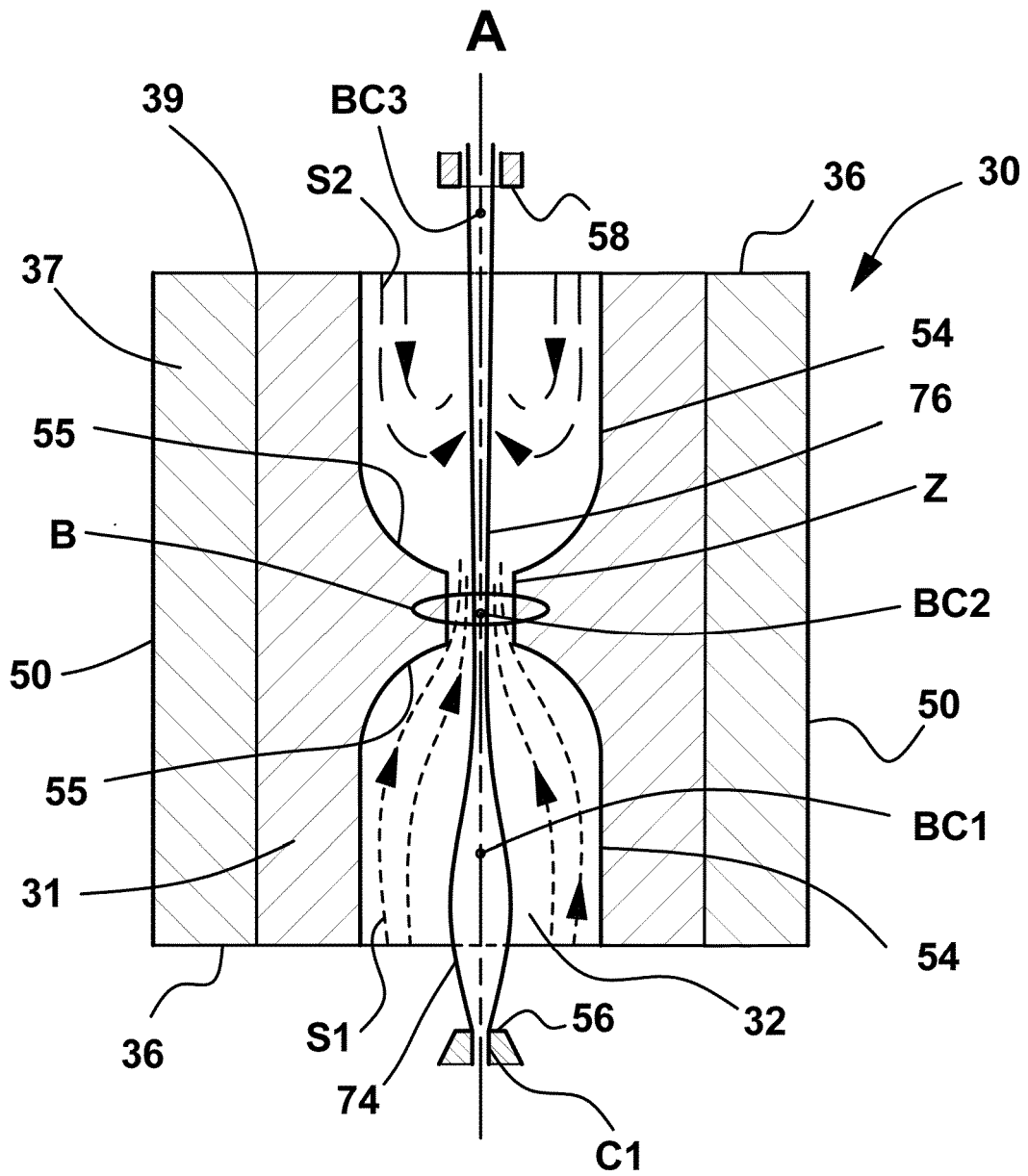


FIG. 5

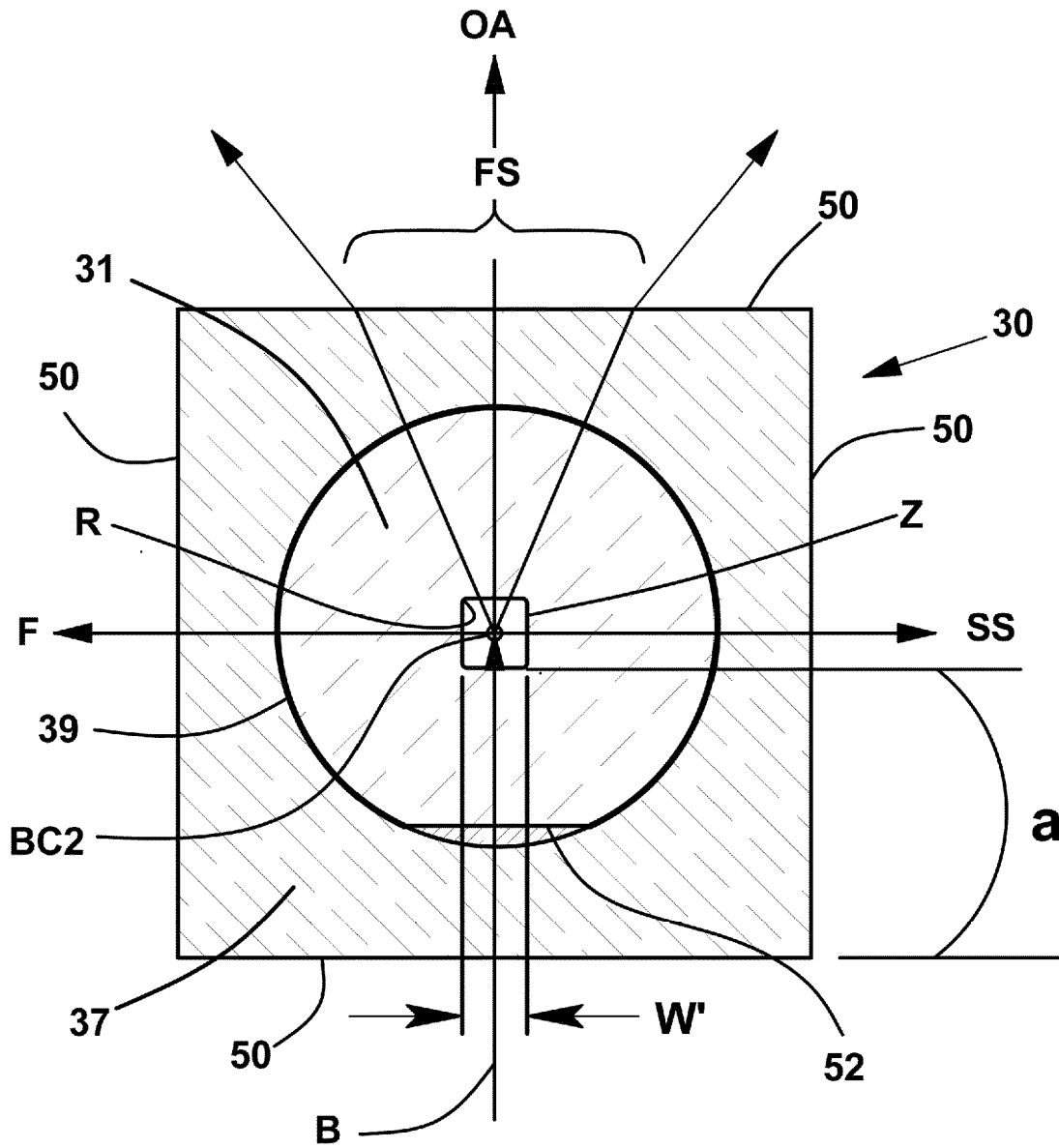


FIG. 6





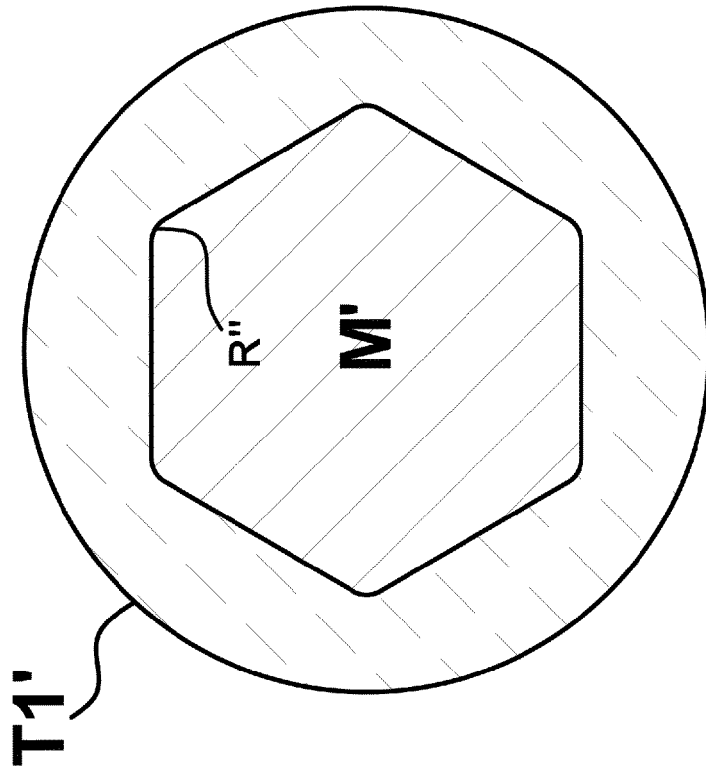


FIG. 8A

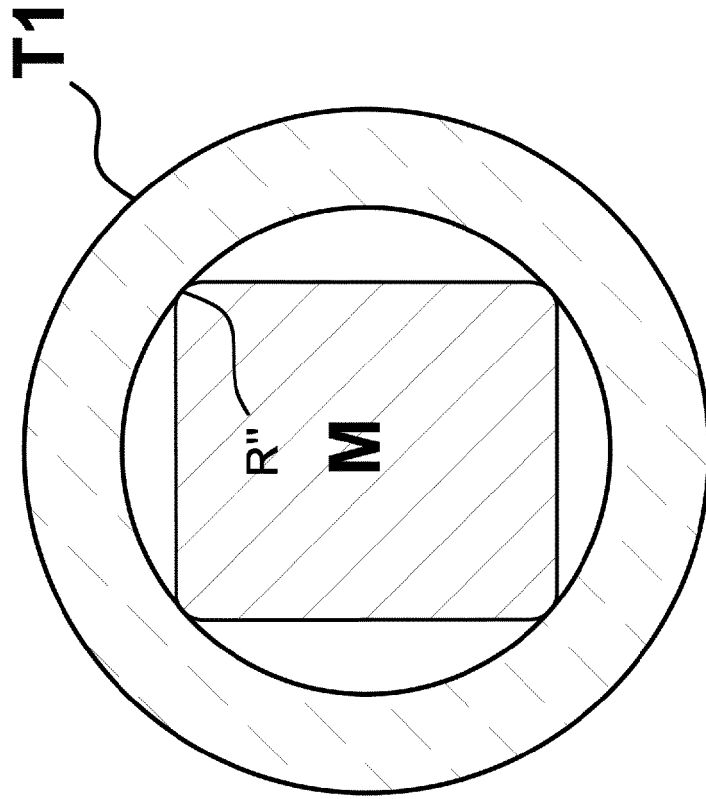


FIG. 8B

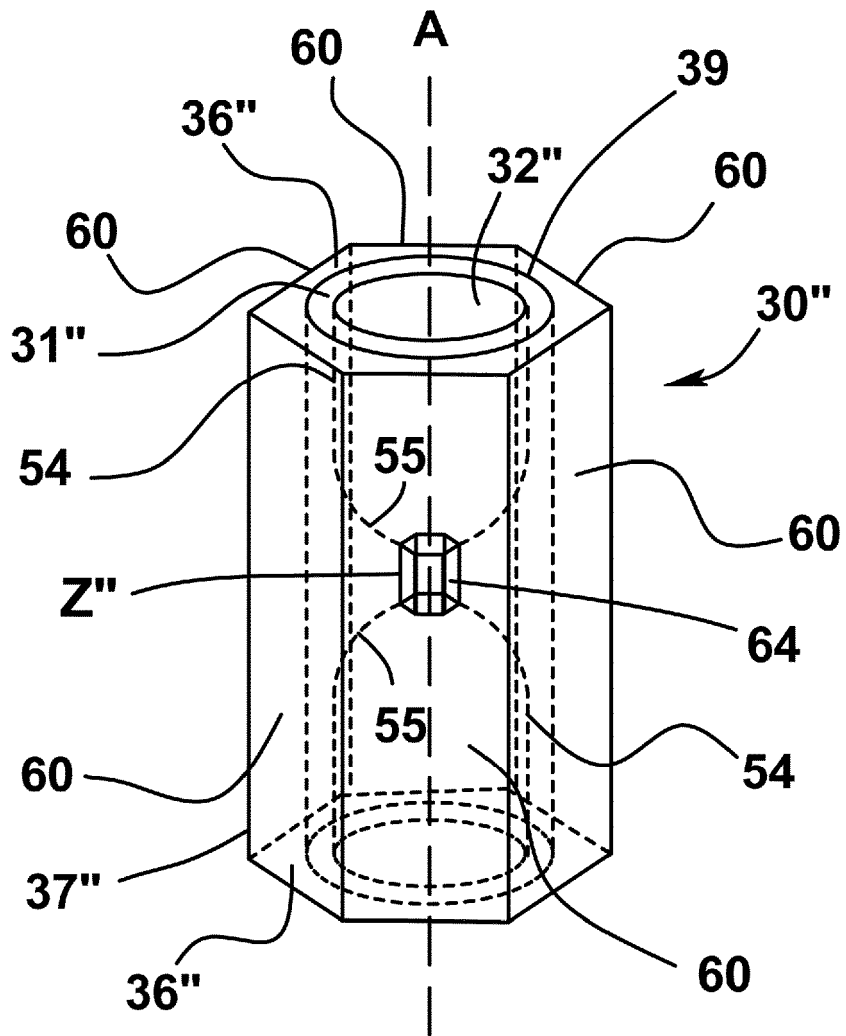


FIG. 9

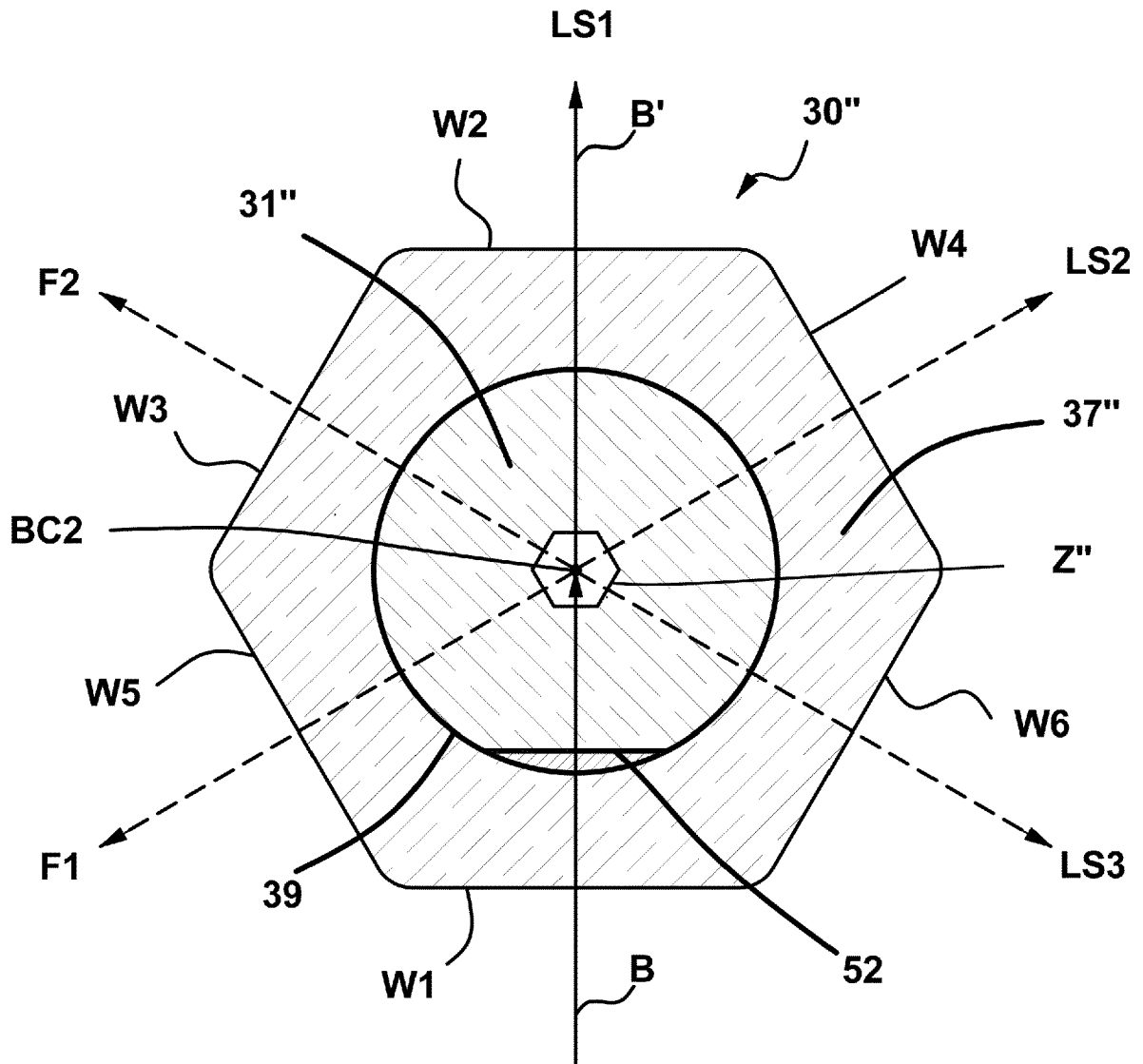


FIG. 10

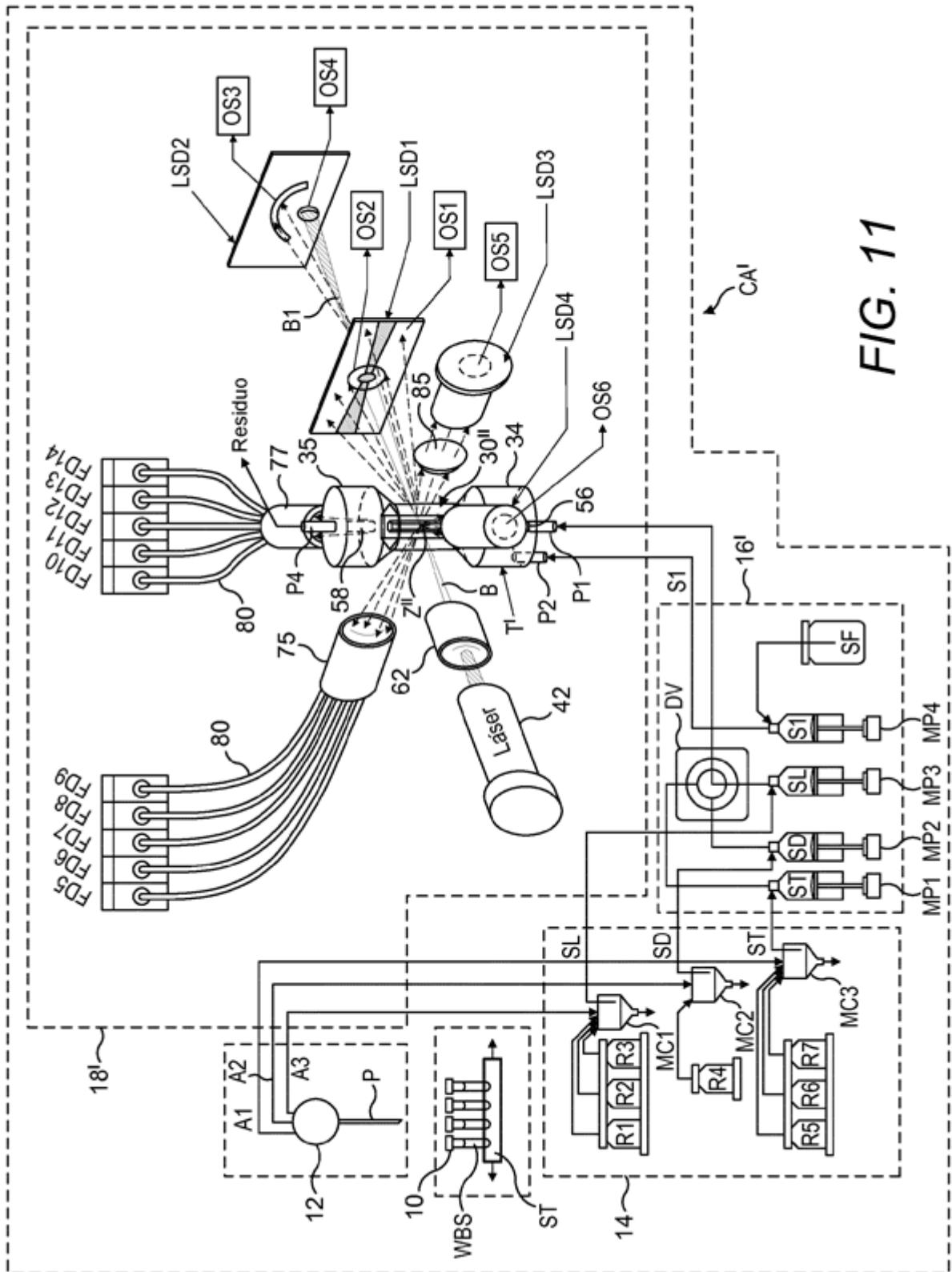


FIG. 11



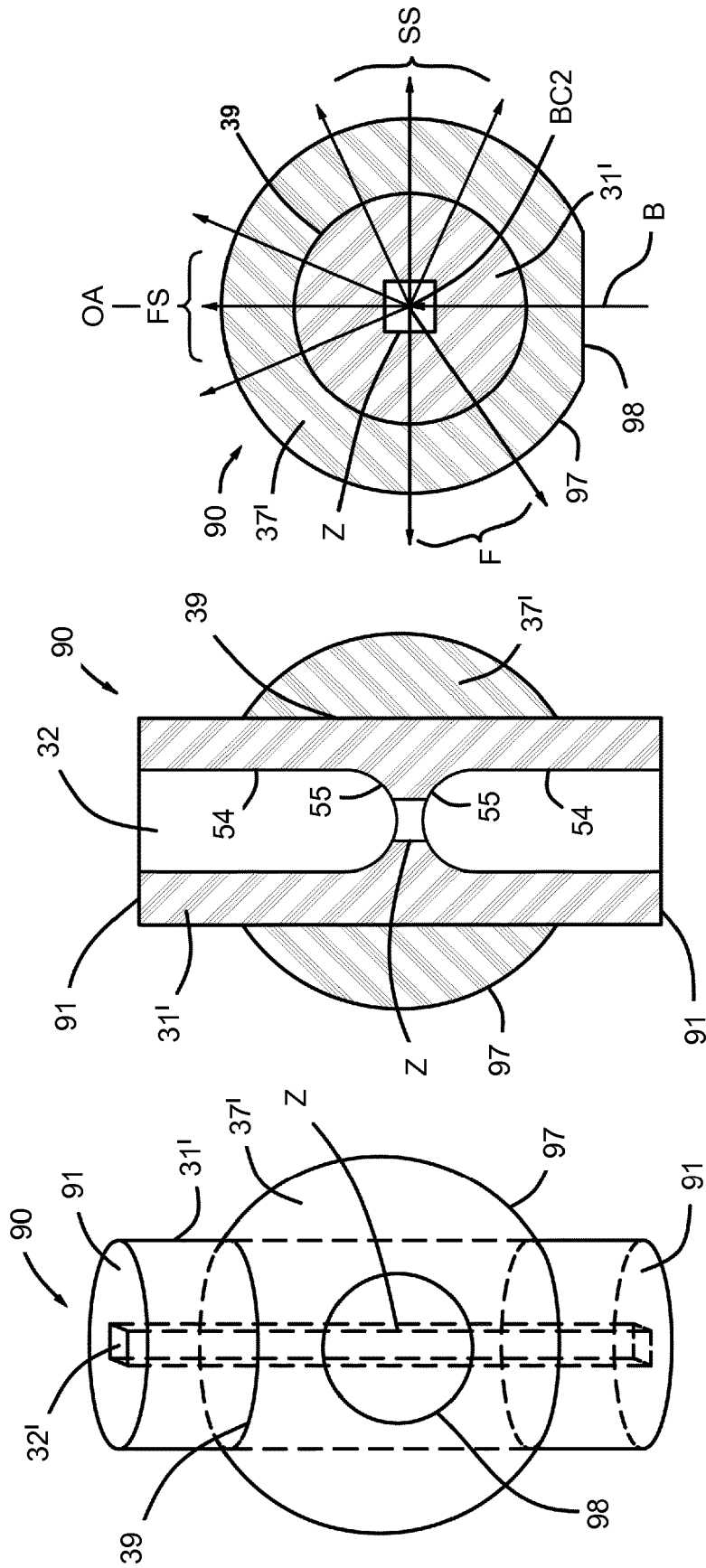


FIG. 13C

FIG. 13B

FIG. 13A







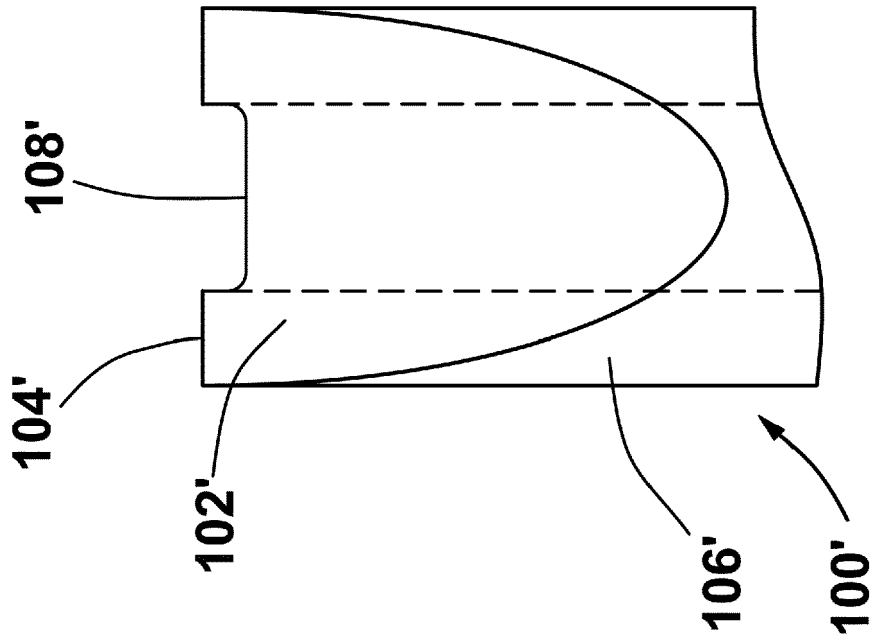


FIG. 16B

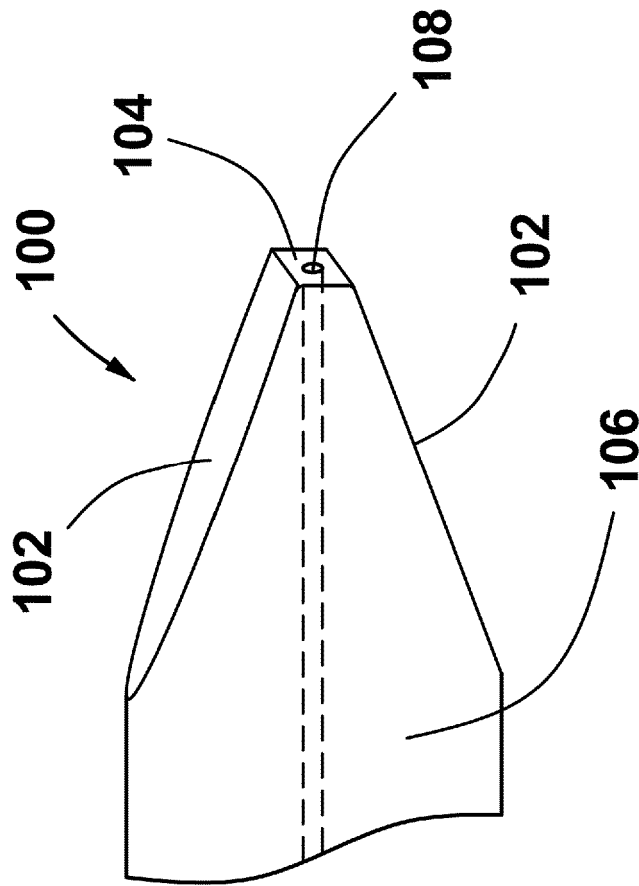


FIG. 16A

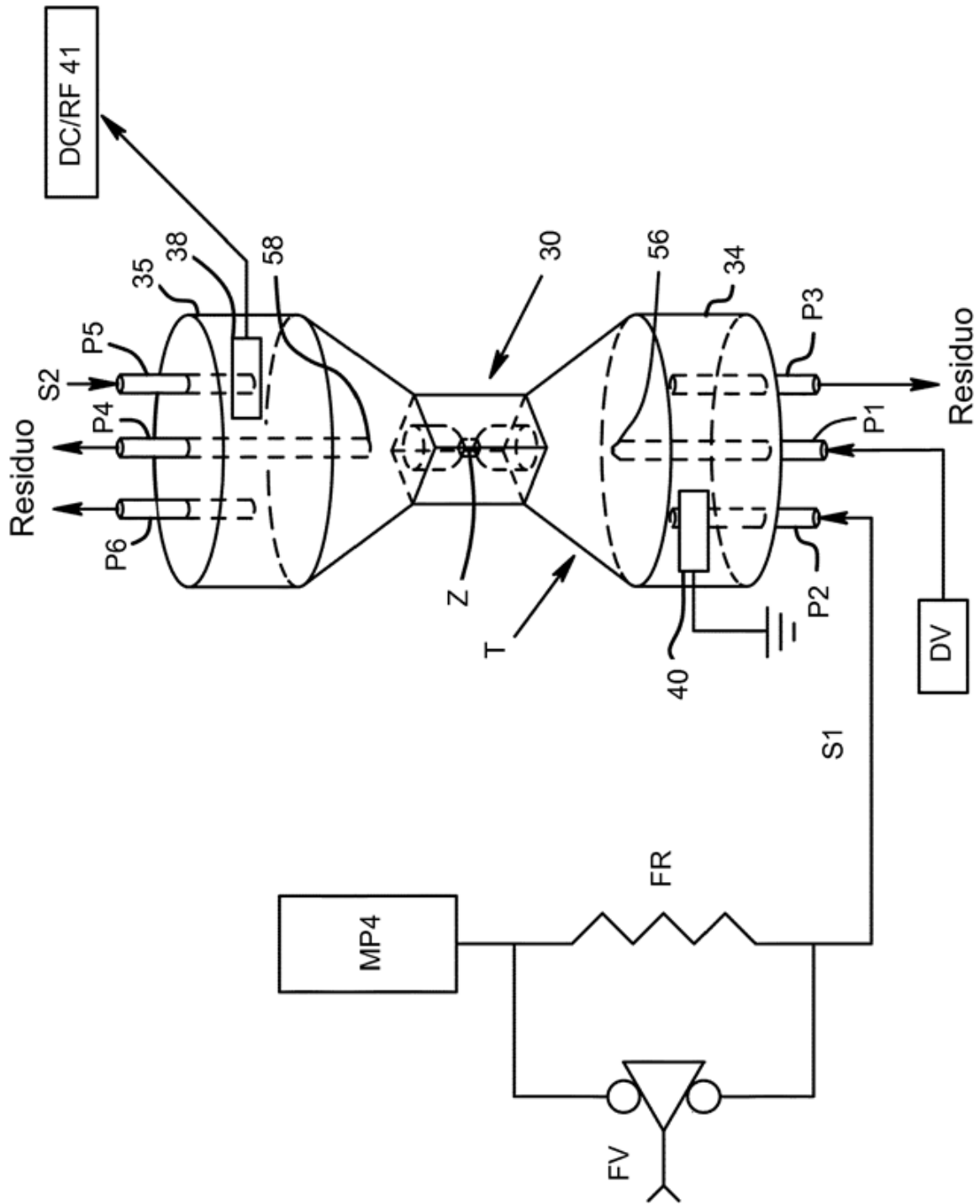


FIG. 17

